

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

**Rolle der Hyaluronsäuresynthase 3 für die
Heilung nach kardialer
Ischämie/Reperfusion**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Marco André Piroth

aus Aachen

Düsseldorf, Dezember 2021

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. Axel Gödecke
Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen als Todesursachen in Deutschland.....	1
1.2 Der Myokardinfarkt	2
1.2.1 Frühphase des Myokardinfarkts	3
1.2.2 Die Inflammationsreaktion	5
1.2.2.1 Neutrophile Granulozyten	5
1.2.2.2 Monozyten und Makrophagen.....	5
1.2.2.3 T-Lymphozyten	6
1.2.2.3.1 T-Zell-Typen.....	6
1.2.2.3.2 T-Zellen im Myokardinfarkt.....	7
1.2.3 Fibroblastenantwort	9
1.3 Das Hyaluronsäuresystem.....	10
1.3.1 Hyaluronsäure	10
1.3.2 Hyaluronsäuresynthese	11
1.3.3 Interaktionen von Hyaluronsäure	12
1.3.4 Hyaluronsäure-Abbau	13
1.4 Hyaluronsäure und Inflammation	14
1.4.1 Hyaluronsäure und T-Zellen.....	14
1.5 Hyaluronsäure und Herzinfarkt	14
1.6 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Tierhaltung und Tierversuche	17
2.1.1 Verwendete Mauslinie.....	17
2.1.2 Operative Induktion der Ischämie und Reperfusion.....	18
2.1.2.1 Ligatur-Anlage.....	19
2.1.2.2 Ischämie-Induktion	19
2.2 Echokardiografie.....	20
2.3 Durchflusszytometrie	21
2.3.1 Blut	24
2.3.2 Milz	24

2.3.3	Lymphknoten	25
2.3.4	Herz.....	25
2.3.4.1	Annexin V Färbung apoptotischer Zellen.....	26
2.3.4.2	Bromdesoxyuridin Färbung proliferativer Zellen	26
2.4	<i>In-vitro</i> T-Zell-Experimente	27
2.4.1	T-Zell-Isolation.....	27
2.4.2	T-Zell-Stimulation.....	28
2.4.3	Immunocytochemische Färbung der perizellulären HA und CD44 ...	29
2.5	Genexpressionsanalyse mit quantitativer <i>Realtime</i> -PCR	29
2.5.1	RNA-Isolation aus frischem Gewebe	30
2.5.2	RNA-Isolation aus formalinfixiertem paraffineingebettetem Gewebe	30
2.5.3	RNA-Isolation aus kultivierten T-Zellen	31
2.5.4	cDNA-Synthese	31
2.5.5	Quantitative Realtime-PCR.....	32
2.6	Histologische Analysen.....	33
2.6.1	Gomori Trichrom Färbung.....	36
2.6.2	Picosiriusrot Färbung.....	37
2.6.2.1	Durchlichtmikroskopie	37
2.6.2.2	Polarisationsmikroskopie	37
2.6.3	MAC-2 Färbung	37
2.6.4	CD68 Färbung	37
2.6.5	Hyaluronsäure Färbung	38
2.6.6	Periostin Färbung	38
2.6.7	CTHRC1 Färbung.....	38
2.6.8	α -SMA Färbung	38
2.6.9	Vimentin Färbung	38
2.6.10	WGA Färbung.....	39
2.7	Statistik.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Validierung des <i>Has3</i> Knockouts	40
3.2	Einfluss der HAS3 auf die kardiale HA-Matrix.....	40
3.3	Analyse der Narbenbildung und Herzfunktion.....	41
3.3.1	Histologische Bestimmung von Narbengröße und Kollagendichte drei Wochen nach Infarkt.....	41

3.3.2	Echokardiografie des Herzens zur Bestimmung der Herzfunktion....	44
3.4	Untersuchung der postischämischen Gewebeumbildung.....	45
3.4.1	Bestimmung der Herzgewichte	45
3.4.2	Expressionsanalyse natriuretischer Peptide im Herzen.....	46
3.4.3	Messung der Kardiomyozytengröße	47
3.5	Einfluss der HAS3 auf die Fibroblastenantwort nach Myokardinfarkt	48
3.5.1	Untersuchung der kardialen Fibroblasten 72 h nach Infarkt	49
3.5.2	Untersuchung der kardialen Fibroblasten 7 d nach Infarkt	51
3.6	Einfluss der HAS3 auf die Immunantwort nach Myokardinfarkt.....	53
3.6.1	Untersuchung zirkulierender Immunzellen naiver Tiere und 72 h nach Infarkt	54
3.6.2	Untersuchung der Immunzellen in der Milz 72 h nach Infarkt	55
3.6.3	Untersuchung von Monozyten und Makrophagen im Herzgewebe 72 h nach Infarkt.....	56
3.6.4	Untersuchung der T-Zell-Subtypen 72 h nach Infarkt.....	62
3.6.4.1	Blut	63
3.6.4.2	Milz	65
3.6.4.3	Lymphknoten	66
3.6.4.4	Herz.....	67
3.6.5	Untersuchung der T-Zell-Subtypen 7 d nach Infarkt.....	68
3.6.5.1	Herz.....	68
3.6.5.2	Milz	71
3.6.5.3	Lymphknoten	72
3.6.5.4	Blut	73
3.7	Mechanistische Untersuchungen isolierter T-Lymphozyten <i>in vitro</i>	76
3.7.1	Expressionsanalyse der Hyaluronsäuresynthasen in T-Lymphozyten	77
3.7.2	Expressionsanalyse von Hyaluronsäurerezeptoren in T-Lymphozyten	78
3.7.3	Untersuchung der Aktivierung <i>Has3</i> -defizienter T-Lymphozyten.....	78
3.7.4	Immunzytochemische Untersuchung von HA und CD44 in T-Lymphozyten.....	79
4	Diskussion	81
4.1	Einfluss des <i>Has3</i> KO auf die kardiale HA-Matrix	82
4.2	Kardiale Funktion und Narbenbildung.....	82
4.3	Hypertrophie.....	83

4.4	Fibroblasten.....	84
4.5	Immunantwort.....	85
4.5.1	Basal und 72 h nach Infarkt	85
4.5.2	7 d nach Infarkt.....	89
4.6	Mechanistische Untersuchungen an T-Zellen <i>in vitro</i>	90
4.7	Limitierung und Ausblick.....	93
5	Zusammenfassung.....	94
6	Summary.....	95
7	Appendix.....	96
8	Abbildungsverzeichnis	100
9	Tabellenverzeichnis	103
10	Literaturverzeichnis	104
11	Originalarbeiten.....	121
12	Posterpräsentationen.....	122
13	Lebenslauf	123
14	Danksagung.....	124
15	Eidesstattliche Erklärung.....	125

Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Alexa Fluor
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i> , α glattes Muskelaktin
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	<i>Brain</i> natriuretisches Peptid
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CCL	CC-Motiv-Chemokinligand
CCR	CC-Motiv-Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CEMIP	<i>Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein</i>
CTHRC1	<i>Collagen triple helix repeat-containing protein 1</i>
cTn	Kardiales Troponin
CX3CR	CX3C-Motiv-Chemokinrezeptor
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
d	Tag
Da	Dalton
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i> , Zerstörungsassoziierte molekulare Muster
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	<i>Dulbeccos Phosphate buffered saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Enddiastolisches Volumen
EKG	Elektrokardiogramm
ESV	Endsystolisches Volumen
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	<i>Fluorescence activated cell scanning</i> , Durchflusszytometrie
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FFPE	<i>formalin fixed paraffin embedded</i> , formalinfixiert paraffineingebettet
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GlcA	Glucuronsäure
GlcNAc	N-acetylglucosamin
h	Stunde
HA	<i>Hyaluronic acid</i> , Hyaluronsäure
HABP	Hyaluronsäure bindendes Protein
HARE	Hyaluronsäurerezeptor für Endozytose

HAS	Hyaluronsäuresynthase
<i>Has3</i>	Hyaluronsäuresynthase 3
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>
<i>hHas3</i>	Humane HAS3
HIER	<i>Heat-induced epitope retrieval</i>
HMGB1	<i>High-mobility-group protein B1</i>
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HSP	Hitzeschockprotein
Hyal	Hyaluronidase
I.E.	Internationale Einheiten
I/R	Ischämie/Reperfusion
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KO	<i>Knockout</i>
LAD	<i>Left anterior descending artery</i> , linke vordere absteigende Arterie
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
Ly6	Lymphozytenantigen 6
LYVE-1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor</i>
MAC-2	Galektin 3
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MHz	Megahertz
MI	Myokardinfarkt
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
NF κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
PCI	Perkutane Koronarintervention
PE	Polyethylen
PEB	Phosphat, EDTA, BSA
POSTN	Periostin
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
qPCR	Quantitative Polymerasenkettenreaktion
RAG1	<i>Recombination activating gene 1</i>
RHAMM	Rezeptor für HA-mediierte Motilität
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
TCR	T-Zell-Rezeptor

TGF β	<i>Transforming growth factor β</i> , transformierender Wachstumsfaktor β
Th	T-Helferzellen
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i> , Gewebeinhibitor von Metalloproteinasen
TLR	<i>Toll-like receptor</i> , toll-ähnlicher Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Treg	Regulatorische T-Zellen
U	Einheit
u.a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromolar
w	Wochen
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i> , Weizenkeimagglutinin
WH	<i>whole heart</i> , ganzes Herz
WT	Wildtyp
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen als Todesursachen in Deutschland

Im Jahr 2019 sind laut statistischem Bundesamt 939.520 Personen in Deutschland verstorben. Dabei wurden bei 331.211 (35,3 %) Fällen, und damit am häufigsten, Krankheiten des Kreislaufsystems als Todesursache angegeben. Gefolgt werden diese von Neubildungen, auf die 239.591 Todesfälle (25,5 %) entfallen. Als, bereits deutlich abgeschlagene, dritthäufigste Todesursache werden Krankheiten des Atmungssystems (67.021 Fälle, 7,1 %) aufgeführt.¹

Betrachtet man die Gruppe der Herz-Kreislauserkrankungen detaillierter, so zeigen sich mit chronisch ischämischer Herzkrankheit (73.459 Fälle, 22,2 %) und akutem Myokardinfarkt (44.282 Fälle, 13,4 %) zwei ischämische Krankheitsbilder als häufigste Todesursachen. Gefolgt werden diese von Herzinsuffizienz (25.297 Fälle, 10,7 %) als klassischer Folge eines Myokardinfarktes und hypertensiver Herzkrankheit (21.937 Fälle, 6,6 %) sowie Vorhofflattern und Vorhofflimmern (20.715 Fälle, 6,3 %) als typischen Risikofaktoren (siehe Abbildung 1).²

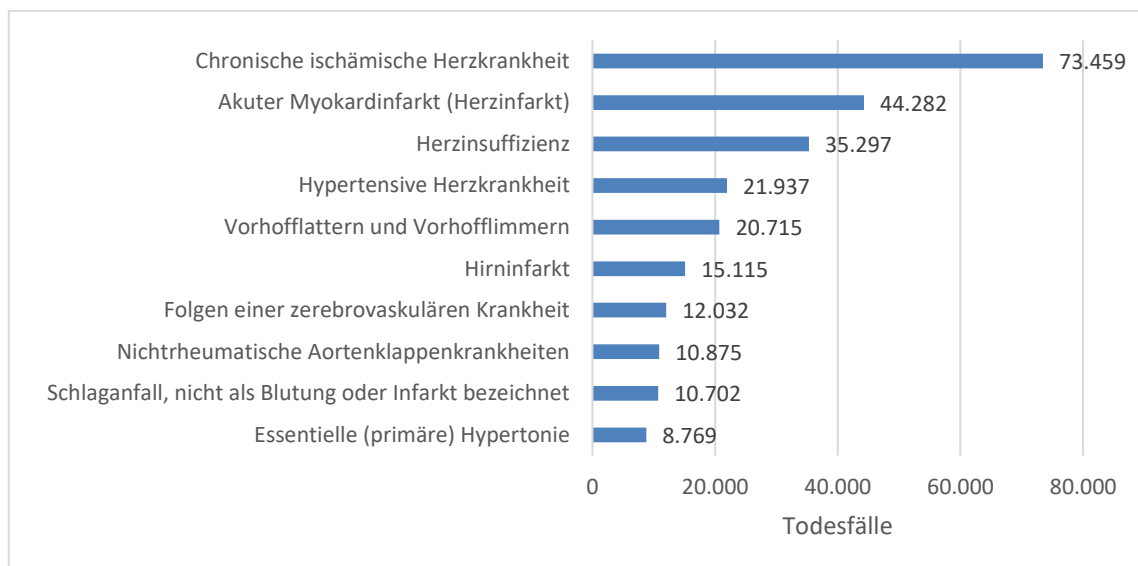


Abbildung 1: Die zehn häufigsten Ursachen kardiovaskulärer Todesfälle in Deutschland 2019.²

Neben den genannten Risikofaktoren Hypertonie und Vorhofflimmern gibt es eine Vielzahl weiterer Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen. Dazu zählen u.a.

Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus Typ 2, Übergewicht, ein inaktiver Lebensstil, Rauchen, hohes Alter, Stress sowie auch eine genetische Prädisposition.³⁻⁵ Diese Risikofaktoren zeigen kardiovaskuläre Erkrankungen als typische Zivilisationskrankheiten, die ihre Auslöser vor allem im westlichen Lebensstil finden. Trotz der fortgeschrittenen Medizin werden sie häufig erst im späteren Verlauf diagnostiziert, sodass meist nur eine symptomatische, jedoch keine kausale Therapie möglich ist.

1.2 Der Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt (MI) stellt eine Verletzung des Herzens durch anhaltende Ischämie und damit einhergehender Unterversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff dar.⁶ Auslöser des akuten MI ist häufig die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques, die, je nach Lokalisation, zu Apoplex, Lungenembolie oder MI führen kann.⁷ Atherosklerose ist eine chronische Erkrankung der Blutgefäße. Dabei kommt es infolge einer Hypercholesterinämie zur Akkumulation von Lipiden in der Gefäßwand. Dies zieht eine chronische Inflammation mit Plaquebildung nach sich. Bei Ruptur dieser Plaques kommt es zur lokalen Thrombozytenaktivierung. Der gebildete Thrombus verschließt nachfolgend entweder das Gefäß am Ort der Bildung oder, bei Ablösung, weiter distal gelegene Gefäße.⁷ Bei Verschluss einer Koronararterie kommt es zum Herzinfarkt. Klassische Symptome sind Brustschmerzen und Kurzatmigkeit. Klinisch dient der Nachweis von kardialen Troponin (cTn) im Plasma als obligatorischer Marker, der auch Aussagen über Infarktgröße und Prognose zulässt.⁸⁻¹⁰ Als Bestandteil des kontraktiven Apparates der Kardiomyozyten wird dieses bzw. die drei Untereinheiten cTn T, cTn C und cTn I infolge der Kardiomyozytenzerstörung ins Blut freigesetzt.^{11, 12} Da cTn I exklusiv im Myokard und nicht in Skelettmuskeln vorkommt, stellt es den selektivsten Marker dar.¹¹ Daneben werden in der Diagnostik weitere Parameter wie EKG-Veränderungen, pathologische Q-Wellen, Identifizierung eines Thrombus oder abnormale Wandbewegungen herangezogen.^{13, 14} Auf Basis der genannten Marker lassen sich MI in fünf Kategorien unterteilen, wobei die Kategorien 1-3 akute MI umfassen und 4-5 MI durch koronare Interventionen.^{14, 15}

Während die Akuttherapie des MI recht weit fortgeschritten ist, stellen die chronischen Folgen nach wie vor eine Herausforderung dar. So sind eine Gefäßöffnung mittels perkutaner Koronarintervention (PCI) und eine antithrombotische Therapie zur Verhinderung weiterer Gefäßverschlüsse als kausale Therapien gut etabliert, während

es zur langfristigen Unterbindung von Gewebeumbau und Herzinsuffizienz kaum kausale Ansätze gibt.^{16, 17} So kommt es nach MI im Bereich der abgestorbenen Kardiomyozyten zur Ausbildung einer kollagenhaltigen Narbe, die keine Kardiomyozyten beinhaltet und weder an der Kontraktion noch an der Reizweiterleitung teilnimmt.^{18, 19} Es entwickelt sich in der Folge eine Herzinsuffizienz mit Hypertrophie der verbliebenen Kardiomyozyten. Durch die veränderten elektrischen Verhältnisse im Herz kann es auch zu Arrhythmien und in der Folge zu weiteren Ereignissen wie Schlaganfall, Lungenembolie oder plötzlichem Herztod kommen.^{20, 21} Auch wenn es erste Ansätze im Bereich antifibrotischer Forschung gibt, mangelt es weiterhin an therapeutischen Zielen zur Beeinflussung des Umbaus der kardialen Matrix.²² Daher ist es wichtig, in der Grundlagenforschung die Prozesse der Postinfarktphase genau aufzuklären, um so Angriffspunkte für neue therapeutische Strategien zu finden.

1.2.1 Frühphase des Myokardinfarkts

Durch den Verschluss herzversorgender Gefäße kommt es bereits innerhalb von acht bis zehn Sekunden zu einem Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff im Herzen. Die Folgen sind das Absterben von Kardiomyozyten und der Beginn einer sterilen Inflammation.²³

Die Sauerstoffunterversorgung führt bereits nach wenigen Sekunden zu einer Reduktion der oxidativen Phosphorylierung und damit einhergehend zu einem Mangel an Adenosintriphosphat (ATP). Als Reaktion wird vermehrt auf die anaerobe Glykolyse zur Energieproduktion zurückgegriffen, die den Bedarf aber nicht adäquat decken kann. Folglich kommt es zu einer Verminderung der kontraktilen Funktion. Zudem akkumulieren ihre Endprodukte, insbesondere Laktat. Durch den ATP-Mangel kommt es außerdem zu einer Anhäufung von Adenosindiphosphat (ADP), was zu einer Aktivierung der Adenylatkinase und dem Abbau zu Adenosinmonophosphat (AMP) führt. Dieses wird wiederum degradiert und so kommt es final zum Verlust von Basen und Nukleosiden.²³

Rund 40 bis 60 Minuten nach Beginn der Ischämie kommt es zu einer Verlangsamung der Stoffwechselveränderungen. Zu diesem Zeitpunkt ist bereits ein Großteil der unterversorgten Kardiomyozyten irreversibel geschädigt. Das Gewebe ist auf unter 10 % des üblichen ATP-Gehalts verarmt und es liegt fast nur noch AMP vor. Zudem liegen ein niedriger pH-Wert und wenig Glykogen im Gewebe vor. Durch den hohen Laktatgehalt in den Zellen verschiebt sich das osmotische Gleichgewicht, was zu einem Anschwellen

der Myozyten führt. Daneben kommt es auch zu Mitochondrienschäden.²³ Beides führt zu einer Nekrose der Kardiomyozyten. Einen weiteren Beitrag zur Kardiomyozytenapoptose leisten die Endothelzellen, welche absterben und lösliche proapoptotische Faktoren freisetzen.²⁴

Die nekrotischen und verletzten Zellen sowie die extrazelluläre Matrix (EZM) setzen infolge der Schädigung reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und eine Vielzahl an *damage-associated molecular patterns* (DAMP) frei. Dazu zählen u.a. ATP, IL1 α , RNA und mitochondriale DNA aus sterbenden Zellen²⁵, aber auch S100 Proteine aus phagozytotischen Immunzellen²⁶ und die von Fibroblasten sekretierten Matrixmoleküle Fibronectin Extradomäne A und Hyaluronsäure (HA).²⁷ Diese DAMP werden von *pattern recognition receptors* (PRR) auf Immunzellen erkannt, von denen die *toll-like* Rezeptoren (TLR), die sich neben Immunzellen auch auf Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten finden, die wichtigsten sind.²⁵ So konnte für TLR2- sowie TLR4-defiziente Tiere eine deutlich verbesserte Herzfunktion nach Myokardinfarkt nachgewiesen werden.^{28, 29} Mechanistisch folgt aus einer TLR-Aktivierung eine Signalkaskade, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF κ B) führt und die Produktion des Tumornekrosefaktors α (TNF α) und weiterer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine initiiert.^{25, 30} Das Fehlen von TNF α führt im Mausmodell zu kleineren Infarkten.³¹

Schon in der Frühphase nach MI kommt der EZM eine bedeutende Rolle zu, da in ihr Zytokine und Chemokine gebunden werden. Durch die Nekrose der Kardiomyozyten wird eine EZM-Degradation durch Matrixmetalloproteasen (MMP) eingeleitet, was zur Freisetzung der gebundenen Faktoren führt. Diese beeinflussen, gemeinsam mit den Matrixfragmenten selbst, die Endothelzellaktivierung. Hierdurch kommt es zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität und einem Austritt von Plasmabestandteilen in den Extrazellulärraum. Im Bereich der abgestorbenen Kardiomyozyten wird schnell eine provisorische Matrix zur Unterstützung des verbleibenden Gewebes gebildet.³²

Neben dem Schaden, der durch den Sauerstoff- und Nährstoffmangel zu Stande kommt, kommt es auch bei der Reperfusion des ischämischen Areals zu einem weiteren Schaden, dem Reperfusionsschaden. Dieser entsteht durch das plötzliche Anfluten von Immunzellen und ROS.^{33, 34}

1.2.2 Die Inflammationsreaktion

In Folge einer I/R kommt es zu einer sterilen Inflammationsreaktion, in deren Verlauf verschiedene Immunzelltypen eine Rolle spielen.

1.2.2.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen, die nach I/R in das infarzierte Herz einwandern.³⁵ Hier fördern sie durch die Sezernierung von Zyto-/Chemokinen, aber auch von ROS und MMP die Immunantwort.^{36, 37} So kommt es z.B. durch die Chemokinfreisetzung sehr schnell zur Chemotaxis von Monozyten, die in das Herzgewebe rekrutiert werden, dort apoptotische Kardiomyozyten und Zelltrümmer aufnehmen und so den Infarktbereich bereinigen. Neutrophile Granulozyten spielen insgesamt eine wichtige Rolle zu Beginn der Inflammation und orchestrieren auch die weitere Immunreaktion. Hierbei ruft eine Interaktion von CXC-Chemokinen mit dem CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2 (CXCR2) eine Konformationsänderung der Neutrophilen hervor, was eine optimale Adhäsion über L- und P-Selektin an die Endothelzellen gewährleistet.^{38, 39} Das aktivierte und dadurch besser permeable Endothel vereinfacht zudem die Migration durch die Gefäßwand ins Gewebe.⁴⁰ Auch wenn gezeigt werden konnte, dass eine übermäßige Infiltration eine erhöhte Mortalität zur Folge hat^{41, 42} und eine Hemmung der Neutrophilenfunktion in einer verbesserten kardialen Funktion nach I/R resultiert⁴³, so ist ein Fehlen von Neutrophilen ebenfalls schädlich, da es zu einer Verschiebung des Makrophagen-Gleichgewichts kommen kann. Während eine schlechtere Phagozytose durch proinflammatorische Makrophagen erfolgte, proliferierten antiinflammatorische Makrophagen verstärkt und es kam zu einer stärkeren Myofibroblastenantwort und Kollagenproduktion.⁴⁴

1.2.2.2 Monozyten und Makrophagen

Obwohl Monozyten mit nur rund 10 % der Gesamtleukozyten im Blut eine relativ kleine Population darstellen, spielen sie dennoch eine wichtige Rolle bei der Inflammation.⁴⁵ Prinzipiell lassen sich bei der Maus im Blut zwei Gruppen von Monozyten anhand ihrer Expression von Lymphozytenantigen 6C (Ly6C) in Ly6C^{high} und Ly6C^{low} unterscheiden.⁴⁶⁻⁴⁸ Dabei infiltrieren zunächst Ly6C^{high} Monozyten das Herz, indem sie auf die endothelgebundenen Faktoren CC-Chemokinligand 2 (CCL2) und *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP1) reagieren. Hierbei spielt der CC-Motiv-Chemokinrezeptor 2 (CCR2) eine wichtige Rolle für die Interaktion.⁴⁹ Die Relevanz dieser Interaktion konnte auch in MCP-1 defizienten Mäusen gezeigt werden,

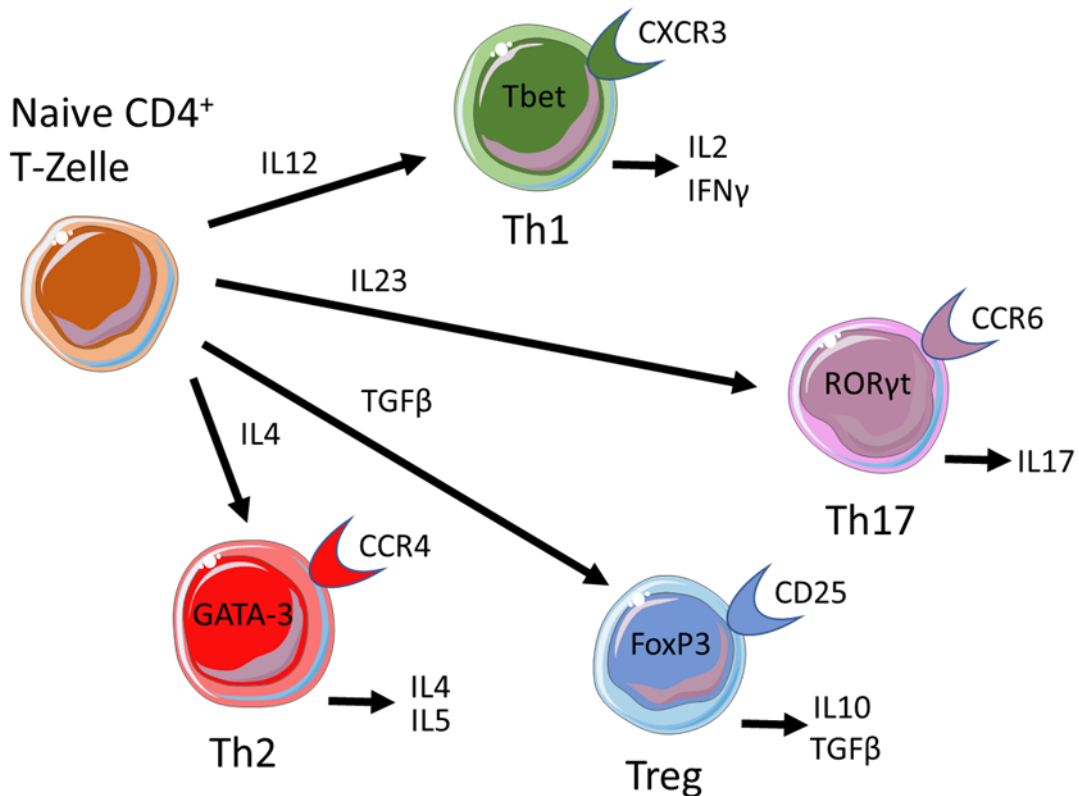
bei denen es zu einer verzögerten Immunantwort kommt.^{50, 51} Die eingewanderten Ly6C^{high} Monozyten bereinigen den Infarktbereich, indem sie apoptotische Zellen und Zelltrümmer aufnehmen. Nachfolgend kommt es zur Einwanderung von Ly6C^{low} Monozyten, die über den Rezeptor CX3CR1 rekrutiert werden.⁴⁹ Diese wirken über Interleukin-10 (IL-10) und über den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF β) antiinflammatorisch und stimulieren die Angiogenese sowie die Myofibroblastendifferenzierung. Im Gewebe lassen sich drei Makrophagenpopulationen unterscheiden. Es gibt zwei Arten residenter Makrophagen, die beide keinen CCR2 exprimieren, aber sich in ihrer Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes II (MHCII) insofern unterscheiden, als dass es eine MHCII^{high} und eine MHCII^{low} Gruppe gibt. Diese beiden Gruppen entwickeln sich bereits im Dottersack und persistieren fortan im Herz. Daneben gibt es eine dritte Population von Makrophagen, die sich aus Monozyten entwickelt. Diese sind sowohl für CCR2 als auch für MHCII positiv.⁵²

1.2.2.3 T-Lymphozyten

Im Gegensatz zu Monozyten/Makrophagen sind Lymphozyten nicht Teil der angeborenen Immunabwehr, sondern gehören zur adaptiven Immunabwehr. Grob werden B-Lymphozyten und T-Lymphozyten unterschieden, die beide im Knochenmark aus Vorläuferzellen entstehen. Die Benennung der T-Zellen beruht auf Reifung der T-Lymphozyten im Thymus.

1.2.2.3.1 T-Zell-Typen

T-Zellen werden in weitere Subtypen unterschieden, zunächst in die CD4⁺, die zytotoxischen CD8⁺ und die CD4/CD8 doppelnegativen Zellen, die im Wesentlichen die sogenannten unkonventionellen $\gamma\delta$ T-Zellen und die natürlichen Killerzellen umfassen. Innerhalb der CD4⁺ T-Zellen lassen sich diverse Subtypen von T-Helferzellen (Th) unterscheiden, von denen als wichtigste Th1, Th2 und Th17 genannt seien. Daneben gibt es regulatorische T-Zellen (Treg).⁵³ Die Subtypen unterscheiden sich u.a. hinsichtlich ihrer Transkriptionsfaktoren, Oberflächenrezeptoren und produzierten Zytokine. Welcher Zelltyp sich aus naiven T-Zellen differenziert, hängt von der Umgebung und dem dort vorliegenden Zytokinmuster ab (siehe Abbildung 2).⁵³



* modifiziert nach Liuzzo et al. 2013. Eur Heart J

Abbildung 2: Übersicht der wichtigsten CD4⁺ T-Zell-Typen.

Je nach Einwirkung verschiedener Zytokine differenzieren naive CD4⁺ T-Zellen in unterschiedliche Subtypen. Dargestellt sind die Zelltypen mit Transkriptionsfaktoren, Oberflächenmarkern und sekretierten Zytokinen.

1.2.2.3.2 T-Zellen im Myokardinfarkt

Während über die Rolle des angeborenen Immunsystems im Kontext des Myokardinfarkts gute Erkenntnisse vorliegen, ist über die Rolle des adaptiven Immunsystems bislang nur wenig bekannt.⁵⁴⁻⁵⁶ Zur Kinetik der T-Zell-Antwort konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen bereits innerhalb von Minuten nach Reperfusion ins Herz einwandern.⁵⁷ Das Maximum der T-Zell-Antwort im Herzen wird drei Tage nach Reperfusion erreicht; bleibt die Reperfusion aus, erst sieben Tage nach Ischämie.⁵⁸ Über die Aktivierung der T-Zellen im Kontext der I/R ist wenig bekannt.⁵⁹ Klassischerweise werden T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) aktiviert, indem über diesen Antigene erkannt werden, die von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) über MHCII präsentiert werden.⁶⁰ Dies findet hauptsächlich in sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten oder der Milz statt. Aufgrund der Geschwindigkeit der Antwort nach I/R lässt sich vermuten, dass es sich nicht um eine

klassische Aktivierung über den TCR handelt, sondern eher um eine nicht-klassische Aktivierung über PRR, wie z.B. TLR, handelt.⁶¹ Dem entgegen stehen Beobachtungen in Mäusen, deren T-Zell-Rezeptoren so verändert sind, dass sie nur durch Ovalbumin aktiviert werden (OT II Mäuse).⁶² Ihre Infarkte sind mit denen CD4⁺ T-Zell-defizienter Mäuse vergleichbar.⁶³

In mehreren Arbeiten konnte eine zentrale Rolle von CD4⁺ T-Zellen bei der Entstehung des Reperfusionsschadens gezeigt werden. So entwickeln *recombination activating gene 1* (RAG1) defiziente Mäuse, in denen reife B- und T-Zellen fehlen, kleinere Infarkte als Kontrolltiere mit normaler Funktion dieser Zellen.⁵⁷ In weiterführenden Versuchen konnte die Rolle der CD4⁺ T-Lymphozyten herausgearbeitet werden. So wurde auch durch Depletion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gezeigt, dass das Fehlen von CD4⁺ T-Zellen, nicht aber das von CD8⁺ T-Zellen, die Infarktgröße verringert.⁵⁷ Daneben wurden die RAG1 KO Mäuse mit Zellen unterschiedlicher Tiere rekonstituiert. Während eine Rekonstitution mit CD4⁺ T-Zellen von C57BL/6J Mäusen zum gleichen Infarktbild wie in den Kontrollen führte, blieben die Infarktgrößen bei Rekonstitution mit CD4⁺ T-Zellen aus Interferon gamma- (IFN γ) oder Adenosinrezeptor 2a- (A2a) defizienten Tieren auf dem Niveau der RAG1 KO Tiere.⁵⁷ Das legt den Schluss nahe, dass IFN γ eine wichtige Rolle beim Reperfusionsschaden spielt und damit auch Th1 Zellen als Hauptproduzent des Zytokins.⁵⁸ Eine Rolle der Th1 Zellen konnte auch in weiteren Arbeiten bestätigt werden, in denen ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Th1-Zellzahl im Myokard und Kardiomyozytenapoptose, Dysbalance in der EZM und einer verminderten Myofibroblastendifferenzierung hergestellt wurde.⁶⁴ Andererseits kann aber auch auf eine Beteiligung von Adenosin, das, wie in 1.2.1 beschrieben, im hypoxischen Gewebe entsteht, über den A2a Rezeptor geschlossen werden. Eine spezifische Aktivierung des Rezeptors führt zu einer verringerten Akkumulation von T-Zellen und kleineren Infarkten.⁵⁷

CD4⁺ T-Zellen sind aber auch wichtig für den Heilungsprozess nach Myokardinfarkt. Nach Depletion von APC und einer deswegen fehlenden Aktivierung von T-Zellen kommt es zu einer verringerten Kollagendisposition und vermehrter Dilatation und Ruptur.⁶⁵ Daneben spielen CD4⁺ T-Zellen auch eine wichtige Rolle bei der Regulation proinflammatorischer Monozyten. Fehlt diese Regulierung, kommt es zu verschlechterter Neovaskularisierung und Kollagenbildung. Die genauen Mechanismen hierfür sind bislang unbekannt.⁶³

Ein weiterer wichtiger Zelltyp sind die Treg. Sie infiltrieren CCR5-abhängig innerhalb von 24h den infarzierten Bereich.^{66, 67} Eine Defizienz von CCR5 führt zu mehr Entzündungsmediatoren im Infarkt.⁶⁶ Außerdem interagieren Treg mit Fibroblasten und sorgen für einen matrixerhaltenden Phänotyp.⁶⁷ Experimentelle Überexpression mit CD28 superagonistischen Antikörpern sowie Depletion mit CD25 Antikörpern konnten zeigen, dass Treg die Immunezellinfiltration ins Herz verringern⁶⁸ und wichtig für Matrixformierung und Angiogenese sind.⁶⁹

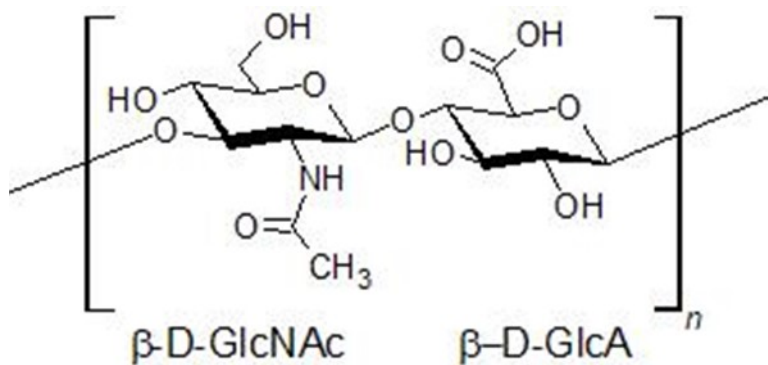
1.2.3 Fibroblastenantwort

Fibroblasten vermitteln nach I/R Wundheilung, kardiales *remodeling* und Narbenbildung.⁷⁰ Darüber hinaus konnte sogar gezeigt werden, dass sie das Überleben von Kardiomyozyten nach einem MI fördern können.⁷¹ Zeitlich durchlaufen Fibroblasten nach MI verschiedene Phasen und Veränderungen. Bis Tag 4 nach MI kommt es zur Aktivierung und einer starken Proliferation, danach bis Tag 7 zur Differenzierung in Myofibroblasten. Diese Differenzierung wird vor allem durch CCL2 und insbesondere TGF- β 1 bewirkt. Die Myofibroblasten exprimieren α -SMA und entwickeln einen kontraktilen Phänotyp, ähnlich glatten Muskelzellen. Neben α -SMA sind die Matrixproteine Periostin (POSTN) und *collagen triple helix repeat containing 1* (CTHRC1) wichtige Marker.^{72, 73} Außerdem produzieren die Myofibroblasten große Mengen EZM, v.a. Kollagen I, Kollagen III, HA und Fibronectin, was zu einer mechanischen Unterstützung der Herzgewebes beiträgt. Aber auch Gewebeinhibitor der Metalloproteinasen (TIMP) wird sezerniert, was den Matrixabbau durch MMP und damit die Inflammationsreaktion unterbindet.^{74, 75} Bei Überschießen dieser Reaktionen kann es zu einer Fibrose des Herzens kommen.⁷⁶ In den Tagen 7-10 findet eine deutliche Reduktion von Proliferation und α -SMA-Expression statt. Zu diesem Zeitpunkt ist eine vollständige Narbe aus kollagenhaltiger EZM ausgebildet, die noch über eine kovalente Quervernetzung der Bestandteile, z.B. durch Lysyl-Oxidasen, Lysyl-Hydroxylasen oder Transglutaminasen, stabilisiert wird. Dies führt zu erhöhter ventrikulärer Steifigkeit und beeinflusst so die mechanischen und signaltransduktorischen Eigenschaften.⁷⁷ Die immer noch aktivierten Fibroblasten bleiben langfristig bestehen und werden als Matrifibrozyten bezeichnet.⁷⁰

1.3 Das Hyaluronsäuresystem

1.3.1 Hyaluronsäure

HA stellt einen wichtigen Bestandteil der EZM dar. Vom chemischen Aufbau her handelt es sich um ein lineares Polysaccharid aus zwei alternierenden Monomeren. Es können Moleküle von einer Masse bis zu 2×10^6 Dalton (Da) gebildet werden.⁷⁸ Als Monomere finden sich einerseits β -D-Glucuronsäure (GlcA) und andererseits N-acetyl- β -D-glucosamin (GlcNAc), die über glykosidische Bindungen verknüpft sind. Die Bindungen bestehen zwischen C1 der GlcA und C3 des GlcNAc (β -1,3-Verknüpfung) sowie zwischen C1 des GlcNAc und C4 der GlcA (β -1,4-Verknüpfung) (siehe Abbildung 3).⁷⁹⁻⁸¹ Anders als viele andere Glykosaminoglykane, wie z.B. Chondroitinsulfat oder Heparansulfat, ist HA weder sulfatiert noch acetyliert oder anderweitig modifiziert.⁸² Durch die Carboxylgruppen der GlcA liegt HA unter physiologischen Bedingungen polyanionisch vor.



* modifiziert nach Noble et al. 2011 Physiol Rev

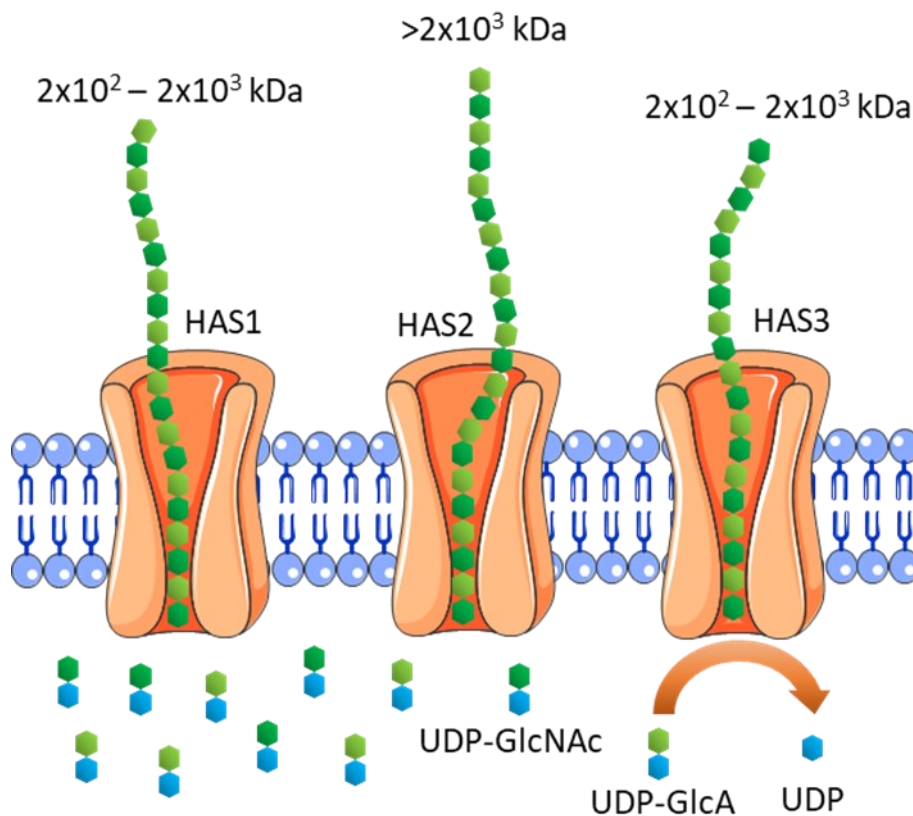
Abbildung 3: chemische Struktur der Hyaluronsäure

HA besteht aus alternierenden Einheiten von N-acetyl- β -D-glucosamin (β -D-GlcNAc) und β -D-Glucuronsäure (β -D-GlcA), die über β -1,3 und β -1,4 glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind.

HA ist in der Lage große Mengen Wasser zu binden. Hierbei kann durch die hydrophile Struktur bereits eine Disaccharideinheit 15 Wassermoleküle in Form einer Solvathülle binden.^{83, 84} Im menschlichen Körper kommt HA in fast allen Geweben vor. Besonders prominent findet sie sich in Nabelschnur, Haut, dem Glaskörper des Auges und in der Synovialflüssigkeit.⁸⁵ Neben ihrer wasserspeichernden Eigenschaft spielt HA auch eine wichtige Rolle als Signalmolekül in der Embryogenese⁸⁶ und inflammatorischen Prozessen⁸⁷, in deren Rahmen sie fragmentiert wird und auch als Oligosaccharid vorliegen kann.⁸⁸

1.3.2 Hyaluronsäuresynthese

Anders als andere Glykosaminoglykane wird HA nicht im Zellinneren im Golgi-Apparat synthetisiert, sondern von membranständigen Hyaluronsäuresynthasen (HAS). Es existieren drei Isoenzyme der HAS: HAS1, HAS2 und HAS3. Diese extrudieren die entstehenden HA-Ketten direkt transmembranär in den Extrazellulärraum (siehe Abbildung 4).^{78, 80} Als Substrate dienen aktivierte Zucker (UDP-N-acetyl- α -D-Glucosamin und UDP- α -D-Glucuronsäure), die an C1 mit Uridindiphosphat verknüpft sind. Diese werden abwechselnd magnesiumabhängig durch die HASen ans reduzierende Ende der Zuckerkette angehängt.⁸² Obwohl die Gene für die drei verschiedenen HASen jeweils bei Mensch und Maus auf drei unterschiedlichen Chromosomen liegen, sind ihre Sequenzen zwischen den Spezies hochkonserviert.⁸⁹



* modifiziert nach Itano et al. 2002 IUBMB Life

Abbildung 4: Darstellung der membranständigen Hyaluronsäuresynthasen 1-3

Die HAS-Isoenzyme synthetisieren HA unterschiedlichen Molekulargewichts unter Abspaltung von UDP aus den aktivierten Zuckern UDP-GlcNAc und UDP-GlcA.

Die Isoformen werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert und unterscheiden sich auch bezüglich ihrer Stabilität. So ist HAS3 die stabilste Isoform, gefolgt von HAS2 und HAS1.⁹⁰ Darüber hinaus kann die HA-Synthese durch viele weitere Faktoren wie TGF- β , IL1 β oder TNF α beeinflusst werden.⁹¹ So konnten Homann et al. eine Induktion der HAS3 durch IL1 β zeigen.⁹² HAS2 ist in den meisten Geweben, wie z.B. auch im Herzen, die vorherrschende Isoform und produziert die meiste HA.⁹³ Im Gegensatz zu HAS1 und HAS3 führt ein Fehlen der HAS2 zu Fehlern in der embryonalen Herzbildung, die zum Tod des Embryos führen.^{78, 86}

Die HA-Synthese lässt sich auch pharmakologisch beeinflussen. Als Inhibitor aller HASen steht 4-Methylumbelliferon (4-MU), ein Cumarinderivat, zur Verfügung. Dieses hemmt kompetitiv die UDP-Glucuronyltransferase und depletiert somit den verfügbaren Pool an UDP-GlcA. Stattdessen wird es selbst glucuronidiert. Daneben konnte gezeigt werden, dass 4-MU auch die mRNA Expression von *Has2* und *Has3* reduziert.⁹⁴⁻⁹⁶

1.3.3 Interaktionen von Hyaluronsäure

Über verschiedene HA-bindende Proteine und HA-Rezeptoren fungiert HA als Signalmolekül. Die am besten bekannten Rezeptoren sind Integrin-Heterodimere, die nach Bindung an EZM-Bestandteile ihre Wirkung über *focal adhesions* ins Zellinnere vermitteln.⁷⁷ Bei den HA-Rezeptoren sind u.a. CD44⁹⁷, der Rezeptor für HA-medierte Motilität (RHAMM)⁹⁸, der HA-Rezeptor für Endozytose (HARE)⁹⁹, der *Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor* (LYVE-1)¹⁰⁰ und TLR-2 und -4, die EZM-Fragmente nach Degradation erkennen^{77, 101}, zu nennen. RHAMM ist mit Funktionen im Zytoskelett, Mikrotubuli und dem Spindelapparat assoziiert, in dem es zur Stabilität beiträgt. In vielen Krebsarten ist es überexprimiert.¹⁰² Über Induktion der fokalen Adhäsionskinase trägt es physiologisch zu einer erhöhten Motilität bei, aber auch pathologisch zu verstärkter Tumorprogression und -metastasierung.¹⁰³

CD44 ist ein transmembranärer Rezeptor, der ubiquitär in den verschiedensten Geweben und Zelltypen exprimiert ist und in diversen Isoformen vorliegen kann.¹⁰⁴ Nach Bindung von HA am extrazellulären Teil kommt es zu einer Konformationsänderung im intrazellulären Teil und hierdurch über Tyrosinkinasen und Rho GTPasen zur Aktivierung von Signalkaskaden. CD44 wird neben Fibroblasten auch auf Immunzellen exprimiert.^{97, 105} Bei T-Zellen gibt es einen Zusammenhang zwischen CD44-Expression und Aktivierungsstatus: Naive T-Zellen sind CD44^{low}, während nach der Aktivierung bei Gedächtnis- und Effektorzellen eine hohe Expression von CD44 vorliegt.¹⁰⁶ Es wird

vermutet, dass CD44 auf T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Formation der immunologischen Synapse mit antigenpräsentierenden dendritischen Zellen spielt.¹⁰⁷ So konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von T-Zell-exprimiertem CD44 mit perizellulärer HA der dendritischen Zellen wichtig für die optimale T-Zell-Aktivierung ist.¹⁰⁸

Unter den HA-bindenden Proteoglykanen zählen Aggrecan, Brevican, Neurocan und Versican zu den wichtigsten.^{109, 110} Über Versican ist bekannt, dass dieses nach Bindung von HA die Zellproliferation, -migration und -adhäsion moduliert.¹¹¹ Außerdem unterstützt es die Bindung von Immunzellen via CD44, L- und P-Selektin^{112, 113} und reguliert das vaskuläre *Remodeling*.¹¹⁴

1.3.4 Hyaluronsäure-Abbau

Der Umsatz von HA erfolgt in den meisten Geweben, eine Ausnahme sind z.B. die Gelenke, sehr schnell. So wird geschätzt etwa ein Drittel der im Körper vorkommenden HA täglich abgebaut und die Halbwertszeit von HA in der Epidermis beträgt nur rund einen Tag.⁸² Verantwortlich für diesen Abbau sind Hyaluronidasen (HYAL). Durch sie erfolgt eine Hydrolyse der glykosidischen β -1,4 Bindungen der HA an Zelloberflächen und in Lysosomen. Bislang konnten sechs Formen der HYAL identifiziert werden, von denen HYAL1 und HYAL2 die wichtigsten sind.^{115, 116} Die wichtige Rolle von HYAL2 wird dadurch unterstrichen, dass, ähnlich wie bei HAS2, eine *Hyal2* Defizienz höchstwahrscheinlich embryonal letal ist.¹¹⁷ Daneben konnte gezeigt werden, dass ein *Knockdown* von *Hyal2* zu einer Akkumulation von HA in Herz und Plasma führt und pathologische Veränderungen der Herzklappen auftreten.¹¹⁸ Funktional wie lokal unterscheiden sich HYAL1 und HYAL2 voneinander. Während HYAL2 an der Zelloberfläche exprimiert wird und HA in ca. 20 kDa große Fragmente spaltet, ist HYAL1 in der Lage, HA bis hin zu Tetrasacchariden zu degradieren. Die Fragmente werden anschließend über HARE endozytiert, wo sie in Lysosomen abgebaut werden.⁸² Das pH-Optimum der HYAL liegt im sauren Bereich, was eine hohe Aktivität in Lysosomen und inflammatorischem Gewebe gewährleistet.¹¹⁹ Ein weiteres HA-abbauendes Protein, das bislang vor allem im Kontext von Krebs untersucht wurde, ist *Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein* (CEMIP).^{120, 121} Es ist bekannt, dass im Rahmen inflammatorischer Prozesse hochmolekulare HA verstärkt degradiert wird und dadurch Einfluss auf Prozesse wie Migration, Apoptose, Proliferation und auch auf die Immunantwort nimmt.¹⁰¹ Neben dem Abbau durch HYAL und CEMIP kann eine Fragmentierung von HA auch chemisch durch ROS stattfinden.⁸¹

1.4 Hyaluronsäure und Inflammation

Erhöhte HA-Konzentrationen im Plasma oder Gewebe sind ein Kennzeichen vieler chronischer Entzündungskrankheiten wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis, Atherosklerose, Morbus Crohn oder Diabetes mellitus Typ 1.^{122, 123} Dabei gibt es zunehmend Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dysregulierter HA-Synthese und einer fehlerhaften Aktivierung des Immunsystems.

1.4.1 Hyaluronsäure und T-Zellen

Für Diabetes mellitus Typ 1 konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die pharmakologische HA-Inhibition durch 4-MU zu einer Reduktion der Immunzellen führte.⁹² So konnte 4-MU im Mausmodell sogar das spontane Auftreten der Erkrankung verhindern. Die zentrale Rolle von HA in der T-Zell-Aktivierung wird dadurch unterstrichen, dass eine Vorbehandlung von T-Zellen mit 4-MU die Aktivierung verhindern kann.¹²⁴ Zentral in der Aktivierung von T-Zellen ist die Interaktion mit APC wie z.B. dendritischen Zellen (DC). Bollyky et al. haben publiziert, dass vor allem die von DC, in denen *Has3* als dominierende Isoform vorkommt, produzierte HA entscheidend für diese Interaktion ist. Darüber hinaus lässt sich die Produktion von HA in DC durch typische Th1-Zell Zytokine wie IL2 und TNF α induzieren.¹⁰⁷ Neuere Arbeiten von Bollyky et al. legen auch eine entscheidende Rolle T-Zell-produzierter HA in der Aktivierung nahe.¹²⁴ In Arbeiten unserer Gruppe konnte im Atherosklerosemodell konkret eine Hemmung der Th1 Antwort in *Has3* KO Mäusen gezeigt werden. Dies ging mit einer reduzierten Makrophageninfiltration in den Plaques einher.⁹²

Ein wichtiger Rezeptor für die Interaktion von Immunzellen mit HA ist das in 1.3.3 bereits erwähnte CD44. So erhöhen T-Zellen infolge der Aktivierung die Expression von CD44, was die Adhäsion ans Endothel und die Extravasation erleichtert.¹²⁵ Das globale Fehlen von CD44 führt zu einer verminderten Gewebsrekrutierung.¹⁰³

1.5 Hyaluronsäure und Herzinfarkt

HA spielt eine wichtige Rolle im Herzen und nach Myokardinfarkt. Das zeigt sich bereits daran, dass das Fehlen von HAS2 aufgrund von Fehlern in der Herzentwicklung embryonal letal ist.⁸⁶ In hypertrophierenden Rattenherzen wurde gezeigt, dass im Verlauf einer Hypertrophie die Expression von HA, den HASen sowie des HA-Rezeptors CD44 ansteigt.¹²⁶ CD44 konnte unter anderem auf Myofibroblasten und T-Zellen

nachgewiesen werden. Das Fehlen von CD44 führt zu einer längeren und stärkeren Immunantwort sowie zu einer verminderten Fibroblasteninfiltration mit geringerer Kollagenbildung. Beides ging mit einem dilatativen *remodeling* einher.¹²⁷ Ebenso konnte bereits 24 h nach akutem Herzinfarkt eine Ödembildung aufgrund von HA- und damit einhergehender Wasser-Akkumulation gezeigt werden.¹²⁸ Studien haben gezeigt, dass die EZM nach Infarkt einem schnellen Umbau unterliegt und den Ablauf moduliert.¹²⁹ So führten Injektionen HA-haltiger Gele in infarzierte Herzen zu einer verbesserten Hämodynamik, kleineren Infarkten und einer verstärkten Neovaskularisierung.¹³⁰⁻¹³²

Unsere Gruppe konnte zeigen, dass die Expression der HASen bereits in den ersten Tagen nach Myokardinfarkt stark reguliert ist. Daneben wurde auch eine Regulation der Rezeptoren RHAMM und CD44 gezeigt.¹³³ Des Weiteren wurde gezeigt, dass IL6 die HA Synthese in Fibroblasten erhöht, während sie durch eine Blockade von IL6 reduziert wurde. Diese Reduktion verschlechterte die kardiale Funktion nach Infarkt.¹³³ In einem weiteren Projekt zu HAS2 kam es in *Has2*-defizienten Tieren zu vermehrter Apoptose von Makrophagen und verminderter Fibroblastenaktivierung.¹³⁴

1.6 Zielsetzung

In Deutschland sind kardiovaskuläre Erkrankungen nach wie vor die häufigste Todesursache. Ein erheblicher Teil dieser Todesfälle entfällt auf Herzinsuffizienz, die nach einem akuten Myokardinfarkt als Folge nachteiligen *remodelings* auftritt.¹ Während die Akuttherapie des Myokardinfarktes sehr ausgereift ist und in fast allen Fällen eine schnelle Revaskularisierung erfolgt, gibt es kaum Strategien, um die Ausbildung der Narbe und die langfristigen Umbauprozesse im Herzen zu beeinflussen. Daher ist ein tieferes mechanistisches Verständnis der Schädigung des Myokards und der Heilung essenziell. So können therapeutische Ansatzpunkte gefunden werden, auf denen zukünftige Strategien zur Verbesserung der Heilung und Verminderung der Langzeitfolgen fußen.

Es ist bekannt, dass die EZM eine große Bedeutung für die Immunantwort nach Myokardinfarkt und genauso für die Narbenbildung hat. Vorarbeiten unserer Gruppe konnten die Wichtigkeit von durch HAS2 produzierter HA für das Makrophagenüberleben und die Fibroblastenaktivierung zeigen.¹³⁴ In weiteren Arbeiten unserer Gruppe zur HAS3 wurde im Kontext der Atherosklerose gezeigt, dass diese die makrophagenvermittelte Plaque-Entzündung über eine verstärkte Antwort von Th1

Zellen verstärkt.⁹² Daneben konnte eine Modulation des Phänotyps glatter Muskelzellen und der Synthese fibrotischer EZM durch HAS3 nachgewiesen werden (unpubliziert).

Diese Ergebnisse zeigen, dass HAS3 einen Einfluss auf die Funktionalität verschiedener Zelltypen hat, die auch für das kardiale *Remodeling* nach MI wichtig sind. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, mit Hilfe *Has3*-defizienter Mäuse die Rolle von HAS3 im Myokardinfarkt zu untersuchen. Der Fokus lag dabei auf der Heilung des infarzierten Herzens, der Bildung der Narbe sowie den Immunzell- und Fibroblastenphänotypen.

2 Material und Methoden

2.1 Tierhaltung und Tierversuche

Alle Tierversuche erfolgten mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen, Bezirksregierung Düsseldorf, unter den Aktenzeichen 84-02.04.2019.A012 und 81-02.04.2018.A079. Zucht und Tierhaltung erfolgte in den Räumen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem 12 h Tag/Nacht Rhythmus, währenddessen den Tieren *ad libitum* entkeimtes Wasser und Haltungsfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) zur Verfügung stand. Alle Tiere, abgesehen von den für die Zellkultur verwendeten, durchliefen im Alter von 10-14 Wochen (w) eine Ischämie mit anschließender Reperfusion (siehe 2.1.2).

2.1.1 Verwendete Mauslinie

Für alle durchgeführten Experimente, abgesehen von den Zellkultur-Experimenten, wurden männliche, ubiquitär konstitutiv *Has3*-defiziente Mäuse (*Has3* knockout (KO) Mäuse) verwendet. Als Kontrollen dienten Wildtypiere (WT), die zur Erreichung maximaler genetischer Übereinstimmung gemeinsam mit den *Has3* KO Tieren gezüchtet wurden.

Die *Has3* KO Tiere wurden von der Firma genOway (Lyon, Frankreich) generiert. Die Insuffizienz des HAS3 Proteins wurde hierbei durch eine genetische Deletion von Exon 2 der murinen *Has3* erreicht, in dem das Startcodon für die Translation liegt. Um das zu erreichen, wurde zunächst eine humanisierte *Has3* knock-in Maus generiert, in der das murine Exon 2 durch die vollständige cDNA-Sequenz der humanen *HAS3* (*hHAS3*) ersetzt wurde. Diese war 5'-seitig durch eine loxP-FRT-Neomycin-FRT Kasette und 3'-seitig durch eine loxP Sequenz flankiert. Durch die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen von 129Sv Mäusen und anschließenden Transfer in C57BL/6J Blastozysten ergab sich eine Maus mit gemischtem Hintergrund. Durch Verpaarung mit Tieren, die konstitutiv eine *Flp*-Rekombinase exprimieren, wurde anschließend die FTR-Neomycin-FRT deletiert. Die sich ergebende Maus verfügte nun anstelle des murinen Exon 2 über eine loxP-*hHas3*-loxP Sequenz. Diese Tiere wurden im nächsten Schritt mit konstitutiv Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen (genOway, Lyon, Frankreich) gekreuzt. Dadurch erfolgte die Entfernung des gesamten humanen Konstruktes an den loxP-Sequenzen, sodass als Resultat eine *Has3* KO Maus

stand, in der konstitutiv und ubiquitär Exon 2 fehlt und somit keine Expression der *Has3* mehr stattfindet.¹³⁵ Durch Verschiebung des offenen Leserahmens wird dennoch ein Protein translatiert, das jedoch durch Fehlen des Exon 2 unfunktional ist (siehe Abbildung 5). Abschließend wurde die Mauslinie unter Verwendung einer beschleunigten kongen Strategie über mindestens sechs Generationen auf einen C57BL/6J Hintergrund zurückgekreuzt, bis sich in Mikrosatelliten-Analysen ein homogener C57BL/6J Hintergrund (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, Frankreich) darstellte.

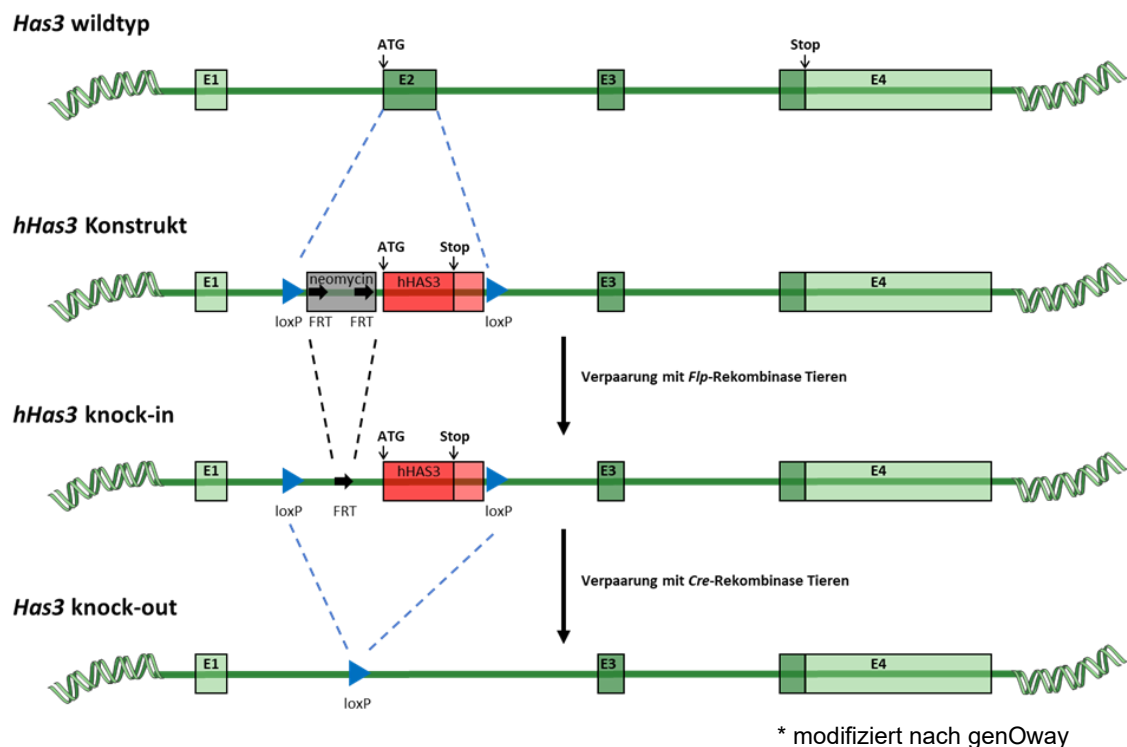


Abbildung 5: Darstellung der Generierung *Has3*-defizienter Mäuse

Zur Generierung *Has3*-defizienter Mäuse wurde zunächst Exon 2 im murinen *Has3* Locus durch die humane *HAS3*-Sequenz ersetzt. Anschließend wurde über Verpaarung mit konstitutiv Flp-Rekombinase exprimierenden Tieren die Neomycin Kasette entfernt, wodurch eine *Has3* KI Maus entstand. Kreuzung dieser mit konstitutiv Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen führte zu *Has3*-defizienten Tieren.

2.1.2 Operative Induktion der Ischämie und Reperfusion

Um räumlich und zeitlich definierte sowie reproduzierbare Myokardinfarkte zu erhalten, wurden diese operativ induziert. Dabei gliedert sich der Prozess in zwei Teile: die lockere Anlage einer Ligatur an der linken vorderen absteigenden Arterie (*left anterior descending arteri* (LAD)) und die zeitlich davon getrennte Induktion der Ischämie durch Zug am Faden und somit Unterbrechung der Perfusion.^{136, 137} Durch die zeitliche

Trennung der beiden Eingriffe ist zum einen eine Trennung des, durch die Eröffnung des Thorax entstehenden, Inflammationsstimulus vom Stimulus durch die Ischämie/Reperfusion (I/R) möglich, zum anderen findet so die I/R bei geschlossenem Thorax statt, was der Situation beim Menschen erheblich näher kommt. Die Operationen wurden von Frau Dr. Simone Gorressen und Herrn Dominik Semmler durchgeführt.

2.1.2.1 Ligatur-Anlage

Zur Anlage der Ligatur wurden die Tiere mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (90 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (15 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Anschließend wurde mit einer Venenverweilkanüle intubiert, die Maus auf einem beheizbaren OP-Tisch fixiert und die Narkose mit einer Mischung sauerstoffangereicherter Raumluft (40 % O₂, V/V) und Isofluran (2 % V/V) aufrechterhalten. Das Tidalvolumen der Beatmung betrug 10 µl/g Körpergewicht bei einer Frequenz von 140/Minute. Die Temperatur wurde permanent rektal gemessen und über die Tischttemperatur konstant auf 38°C gehalten. Der Thorax wurde im vierten Interkostalraum eröffnet und die LAD unter Verwendung eines Operationsmikroskopes mit 7-0 Prolene Faden umschlungen. Beide Enden des Fadens wurden durch einen 1 mm dicken Polyethylen (PE)-Ring mit 0,5 mm Innendurchmesser und aus dem Thorax geführt. Thorax und Muskeln wurden mit 4/0 Seide verschlossen. Die Fadenenden wurden miteinander verknotet und in einer Hauttasche platziert. Die Haut wurde anschließend mit 5-0 Prolene verschlossen.

Zum Abschluss der OP wurde die Isoflurannarkose beendet, nach Rückkehr der Reflexe extubiert und die Maus noch bis zur vollständigen Erholung warmgehalten. Die postoperative Analgesie erfolgte durch Buprenorphingabe.

2.1.2.2 Ischämie-Induktion

Drei Tage nach Ligatur-Anlage erfolgte die Ischämie-Induktion. Hierzu wurde die Maus in einer Kammer mit einer Mischung sauerstoffangereicherter Luft (40 % O₂, V/V) und Isofluran (2 %, V/V) narkotisiert und wiederum auf dem beheizten OP-Tisch fixiert, wo eine weitere Maskenbeatmung mit der genannten Mischung erfolgte. Auch die Körpertemperatur wurde wie bei der Ligatur-Anlage beschrieben geregelt. Zudem wurden Elektrokardiogramm (EKG)-Elektroden zur Kontrolle der Ischämie angelegt. Die Haut wurde geöffnet und die Fadenenden nach außen geführt, wo durch Anhängen von Gewichten an die Fäden für 45 Minuten ein Zug von 10 g angewendet wurde. Die erfolgreiche Induktion wurde durch Kontrolle der ST-Hebung im EKG (*Basic Data*

Acquisition Software, Harvard Aparatus, Holliston, Massachusetts, USA) gewährleistet. Nach Ende der Ischämiezeit wurden die Fäden durchschnitten und somit eine Reperfusion des ischämischen Areals eingeleitet. Die Haut wurde mit 5-0 Prolene verschlossen. Die Analgesie wurde wiederum durch Gabe von Buprenorphin sichergestellt.

2.2 Echokardiografie

Zur genauen Erfassung der kardialen Funktionsparameter wurden die Tiere sowohl vor der Ligatur-Anlage sowie auch 24 h, 1 w, 2 w und 3 w nach I/R-Induktion echokardiografisch untersucht. Die Bildgebung erfolgte mit einem hochauflösenden Ultraschallgerät mit 18-38 Megahertz (MHz) Schallkopf (Vevo3100 oder Vevo2100, VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Kanada). Für die Untersuchung wurden die Mäuse in eine Isofluran-Narkose (2 % V/V) versetzt, um Abwehrverhalten und Angst zu vermeiden. Zur Überwachung lagen die Tiere während der Untersuchung auf einem beheizten Elektroden-Kontakt-Pad, das die Aufzeichnung von Herzfrequenz und EKG ermöglicht und eine konstante Körpertemperatur der Maus gewährleistet. Vor Beginn der Echokardiografie wurde der Thorax mit Hilfe von Haarentfernungscreme enthaart und vorgewärmtes Aquasonic 100 Gel (Parker Laboratories, Fairfield, NJ, USA) aufgetragen. Anschließend wurden parasternal die lange und kurze Achse des linken Ventrikels aufgenommen. Darüber hinaus erfolgten Aufnahmen im M-Mode mit einer Platzierung des Schallkopfes über dem Apex, was eine Vierkammersicht und eine genaue Beurteilung des Blutflusses durch die Mitralklappe erlaubt. Auf Basis der gemachten Aufnahmen konnten u.a. die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF), das endsystolische und enddiastolische Volumen (ESV bzw. EDV), das Herzschlagvolumen, fraktionelle Flächenänderungen und Wanddicken bestimmt werden.¹³⁸ Die echokardiografischen Untersuchungen erfolgten durch Frau Dr. Simone Gorressen und Herrn Dominik Semmler.

2.3 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische (*Fluorescence activated cell scanning* (FACS)) Analysen wurden zur Charakterisierung von Immunzellen, Fibroblasten und Endothelzellen in Blut, Lymphknoten, Milz und Herz durchgeführt. Hierzu wurden die Gewebe unmittelbar nach der Gewinnung aus der Maus, wie in den entsprechenden Abschnitten beschrieben, zu Einzelzellsuspensionen prozessiert, die dann nach Antikörperfärbungen mittels eines LSRFortessa Durchflusszytometers (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) vermessen wurden. Zur Ermittlung der absoluten Zellzahlen wurden Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter Inc., Krefeld, Deutschland) genutzt. Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der FlowJo™ Software (BD Franklin Lakes, NJ, USA). Vollständige *Gating*-Schemata aller durchgeführten Analysen finden sich im Appendix.

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Hersteller
Annexin V - FITC	N/A	BioLegend, San Diego, CA, USA
BrdU - AF488	3D4	BioLegend, San Diego, CA, USA
CCR2 - BV421	SA203G11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD115 - BV711	AFS98	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD11b - PE/Dazzle 594	M1/70	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD16/32 - unkonjugiert	93	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD19 - PacBI	6D5	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD3 - AF700	17A2	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD3 - APC/Cy7	17A2	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD31 - PE/Cy7	390	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD4 - FITC	RM4-5	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CD45 - PE	30-F11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD45 -AF700	30-F11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD64 - PE	X54-5/7.1	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD8a - AF647	53-6.7	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD8a - APC	53-6.7	BioLegend, San Diego, CA, USA
Feeder cells - PE	mEF-SK4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
ITGA7 - APC	334908	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Live/Dead Aqua	N/A	Life Technologies, Eugene, OR, USA
Ly6C - APC/Cy7	HK1.4	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ly6G - BV650	1A8	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ly6G - BV785	1A8	BioLegend, San Diego, CA, USA
MHCII - PE/Cy7	AF6-120.1	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ter - FITC	Ter-119	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
CCR6 (CD196) - BV786	29-2L17	BioLegend, San Diego, CA, USA

CD69 - BV650	H1.2F3	BioLegend, San Diego, CA, USA
CXCR3 - BV605	CXCR3-173	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD62L - PacBI	MEL-14	BioLegend, San Diego, CA, USA
CCR4 (CD194) - PerCP-Cy5.5	2G12	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD44 - PE/Cy7	IM7	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD45 - PE/Cy5	30-F11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD25 - PE	3C7	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD11c - APC/Cy7	N418	BioLegend, San Diego, CA, USA

Tabelle 2: Verwendete Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Erythrozyten Lyse Puffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA	Eigene Herstellung
PEB Puffer	2 mM EDTA 0,5 % BSA in DPBS	Eigene Herstellung
Heparin/PBS	0,4 % Heparin (5000 I.E./mL) in DPBS	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Isotoner FACS Puffer	BD FACS Flow Trägerflüssigkeit	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
RPMI 10 % Medium	RPMI Medium 1640 + GlutaMAX™-I 10 % FCS 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
Hank's balanced salt solution (HBSS)	1,26 mM CaCl ₂ 0,49 mM MgCl ₂ 0,41 mM MgSO ₄ 5,3 mM KCl 0,44 mM KH ₂ PO ₄ 4,17 mM NaHCO ₃ 137,39 mM NaCl 0,34 mM NaH ₂ PO ₄ 5,55 mM Glukose	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
Enzymatische Verdaulösung	549 U/mL Kollagenase I 60 U/mL DNase I in HBSS	Eigene Herstellung
Fixierlösung	1 % (V/V) Roti®-Histofix 10% in DPBS	Eigene Herstellung

2.3.1 Blut

Zur Immunzellanalyse im Blut wurde das Blut unmittelbar bei der Entnahme aus der Maus durch Zugabe von EDTA antikoaguliert. Zu Beginn der Färbung wurden Fc-Rezeptoren, die zu einer unspezifischen Antikörperadsorption führen könnten, mit einem CD16/32-Antikörper für 10 Minuten bei 4°C geblockt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von speziellen Antikörpermischungen zur Markierung der relevanten Zellpopulationen. Es folgte eine weitere 15-minütige Inkubation bei 4°C, in deren Anschluss Erythrozyten-Lyse Puffer (siehe Tabelle 2) zugegeben und exakt 7 Minuten bei 4°C inkubiert wurde. Danach wurde 10 Minuten bei 4°C und 800 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet resuspendiert. Im Fall des Panels zur Untersuchung von T-Zell-Subtypen (Th1, Th2, Th17, Treg) wurde diese Zellsuspension vermessen. Beim Panel zur kombinierten Untersuchung von Lymphozyten und Monozyten wurde zur Zellfixierung für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Fixierlösung (siehe Tabelle 2) fixiert. Abschließend folgte ein Waschschritt, in dem nach Zugabe von 1 mL DPBS erneut 10 Minuten bei 4°C und 800 x g zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in PEB resuspendiert und anschließend ebenfalls im BD LSRFortessa vermessen. Die Resultate wurden als absolute Zellzahl pro µL Vollblut bzw. im Fall der T-Zell-Subtypen prozentual dargestellt. Eine Übersicht aller verwendeten Antikörper findet sich in Tabelle 1.

2.3.2 Milz

Zur Untersuchung der Immunzellpopulationen in der Milz musste zunächst eine Einzelzellsuspension erzeugt werden. Hierzu wurde die Milz nach der Entnahme aus der Maus zusammen mit 3 mL PEB in ein gentleMACS C-Röhrchen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gegeben und mithilfe eines gentleMACS *dissociators* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) zerkleinert. Die erhaltene Suspension wurde anschließend durch einen 70 µm Nylonfilter (Greiner Bio-One, Frankfurt, Deutschland) filtriert und bei 4°C und 300 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in DPBS aufgenommen und zur Antikörperfärbung verwendet. Hierzu wurde zunächst zur Blockade von Fc-Rezeptoren 10 Minuten bei 4°C mit CD16/32 Antikörpern inkubiert bevor die Zugabe von *LIVE/DEAD™ fixable aqua* (Life Technologies, Eugene, OR, USA) zur Markierung toter Zellen erfolgte. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurde einmal mit DPBS gewaschen, die Zellen in PEB aufgenommen und mit entsprechenden Antikörperkombinationen für Lymphozyten und Monozyten oder für T-Zell-Subtypen gefärbt. Es wurde 15 Minuten bei 4°C mit den

Antikörpern inkubiert und dann zur Erythrozytenlyse mit Lysepuffer versetzt. Nach exakt 7 Minuten Einwirkzeit wurde zentrifugiert (800 x g, 4°C, 10 Minuten). Für die T-Zell-Subgruppen wurden die Zellen direkt resuspendiert und vermessen, für die Lymphozyten und Monozyten folgte noch eine 20-minütige Fixierung in Fixierlösung (siehe Tabelle 2) bei Raumtemperatur, bevor auch diese nach einem Waschschrift mit PEB vermessen wurden.

2.3.3 Lymphknoten

Zur näheren Untersuchung der T-Zell-Subtypen wurden auch Lymphknoten untersucht. Hierzu wurden drei kraniale mediastinale Lymphknoten¹³⁹ entnommen und gepoolt. Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension wurden diese in gentleMACS C-Röhrchen gegeben und im gentleMACS *dissociator* zerkleinert. Anschließend wurde die Suspension bei 4°C und 300 x g zentrifugiert, die Zellen in PEB aufgenommen und zur Färbung verwendet. Zunächst wurden die Fc-Rezeptoren durch 10-minütige Inkubation mit CD16/32 Antikörpern bei 4°C blockiert. Nach Inkubation wurden die Antikörper zur Färbung zugegeben und 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PEB wurden die Zellen in PEB aufgenommen und vermessen.

2.3.4 Herz

Vor der Organentnahme wurde das Herz zunächst in der Maus mit Heparin/PBS (siehe Tabelle 2) durchspült, um sie von Blut zu befreien. Anschließend wurde das Herz entnommen, an der Aorta an einer speziellen Kanüle aufgehängt und retrograd mit auf 37°C erwärmter enzymatischer Verdauung (siehe Tabelle 2) bei einem Durchfluss von 2 mL/min perfundiert. Die Enzymlösung wurde aufgefangen, das Herz von der Kanüle geschnitten und mit einer Schere zerkleinert. Die Gewebestücke wurden für weitere 15 Minuten bei 37°C in einem MACSmix™ *tube rotator* verdaut. Anschließend wurde die gesamte Suspension erst durch einen 100 µm Nylonfilter und dann durch einen 40 µm Nylonfilter gegeben. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 300 x g wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C in RPMI 10% (siehe Tabelle 2) im MACSmix™ *tube rotator* inkubiert. Vor der Verwendung zur Färbung wurde nochmals zentrifugiert und die Zellen in DPBS resuspendiert.

Zu Beginn der Antikörperfärbung wurden die Zellen zur Blockade der Fc-Rezeptoren mit CD16/32 Antikörpern und nachfolgend mit *LIVE/DEAD™ fixable aqua* inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS folgte die Färbung mit verschiedenen Antikörperkombinationen zur Detektion von Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen,

Fibroblasten und T-Zell-Subtypen. Die Zellen wurden noch einmal mit PEB gewaschen, bevor einige Proben bereits vermessen werden konnten. Bei Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten wurden über die Färbung der Oberflächenmarker zur Zellidentifizierung hinaus noch weitere Färbungen zur Darstellung apoptotischer und proliferativer Zellen durchgeführt, die in 2.3.4.1 und 2.3.4.2 beschrieben werden.

Als Kontrolle auf Blutkontaminationen im Herz wurde zusätzlich eine Erythrozytenfärbung durchgeführt. Hierzu wurden zunächst mit CD16/32 Antikörpern und anschließend mit einem Antikörper gegen Ter119 inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Proben vermessen und der Erythrozytenanteil an den Gesamtzellen bestimmt.

2.3.4.1 Annexin V Färbung apoptotischer Zellen

Im Anschluss an die bereits in 2.3.4 beschriebenen Schritte erfolgte hier nach der letzten Zentrifugation eine Aufnahme der Zellen in *Annexin-V-Binding Buffer* (Biolegend, San Diego, CA, USA) und es wurde 15 Minuten bei 4°C mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V (BioLegend, San Diego, CA, USA) inkubiert. Dieses bindet Phosphatidylserin, das bei apoptotischen Zellen auf der Zelloberfläche zu finden ist. Nach Zugabe von weiterem Puffer wurden die Proben vermessen.

2.3.4.2 Bromdesoxyuridin Färbung proliferativer Zellen

Zur Markierung proliferierender Zellen wurde den Tieren vier Stunden vor der Organentnahme 1 mg Bromdesoxyuridin (BrdU) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) intraperitoneal gespritzt.^{70, 140} Dieses wird anstelle von Desoxythymidin bei der DNA-Replikation eingebaut. Somit lassen sich Zellen erkennen, die im Zeitraum zwischen Applikation und Tod DNA repliziert haben. Da hierfür eine Färbung der DNA notwendig ist, wurde diese nach den in 2.3.4 beschriebenen Schritten noch angehängt.

Nach der letzten beschriebenen Zentrifugation wurden die Zellen zunächst mit Fix & Perm Medium (Life Technologies, Eugene, OR, USA) fixiert und permeabilisiert. Dazu wurde erst 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Fix & Perm Medium A inkubiert, zentrifugiert und dann 15 Minuten mit Fix & Perm Medium B inkubiert. Anschließend erfolgte ein DNA-Verdau durch Inkubation in einer 1200 U/mL Lösung von DNase I (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) in HBSS für eine Stunde bei 37°C. Nach einem Waschschrift mit PEB wurden die Zellen erneut in Fix & Perm Medium B aufgenommen

und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einem BrdU-Antikörper gefärbt. Vor der Messung wurde noch einmal mit PEB gewaschen.

2.4 *In-vitro* T-Zell-Experimente

Für mechanistische Untersuchungen wurden T-Zellen aus der Milz isoliert und in Kultur stimuliert. Anschließend wurden das Medium und die mRNA Expression untersucht. Hierbei wurden in einem Ansatz ausschließlich Zellen von WT-Tieren verwendet. Anhand dieser wurden Expressionsunterschiede der HAS und HA-Rezeptoren nach Stimulation untersucht. Daneben wurden in einem zweiten Ansatz WT-Zellen und *Has3* KO Zellen hinsichtlich ihrer Expression von *Il2* und *Ifny* unter verschiedenen Stimulationsbedingungen verglichen.

2.4.1 T-Zell-Isolation

Die Gewinnung der T-Zellen erfolgte aus der Milz von naiven WT und *Has3* KO Mäusen. Hierzu wurde die Milz entnommen, in ein, mit 3 mL PEB vorgefülltes, gentleMACS C-Röhrchen überführt und mit dem *gentleMACS dissociator* zerkleinert. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch ein 40 µm Nylon Zellsieb filtriert und anschließend bei 400 x g für 7 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in Erythrozyten Lyse Puffer resuspendiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 10 mL PEB wurde erneut zentrifugiert (400 x g, 7 Minuten) und die T-Zellen gemäß Herstellerprotokoll mithilfe des *Mouse Pan T-cell isolation kit II* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gewonnen. Hierbei wurde auf Basis vorhergehender Versuche von 25 Millionen Zellen ausgegangen. Zunächst wurde das Pellet in 100 µL PEB resuspendiert und dann mit 25 µL des Cocktails biotinylierter Antikörper versetzt. Hierdurch wurden alle Zellen außer den CD3⁺ T-Zellen markiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei 4°C wurden 75 µL PEB und 50 µL Anti-Biotin *MicroBeads* zugegeben. Nach erneuter 10-minütiger Inkubation bei 4°C wurden 500 µL PEB hinzugefügt und die Suspension über LS-Säulen, die im magnetischen Feld eines MACS *separator* platziert waren, gegeben und die Säule mit 3 mL PEB gewaschen. Dabei blieben alle über die Antikörper und die *MicroBeads* markierten Zellen auf der Säule zurück, während die unmarkierten T-Zellen die Säule passieren konnten und mit dem Eluat aufgefangen wurden. Die so erhaltenen T-Zellen wurden auf eine Konzentration von 6 Millionen Zellen pro mL in AIM-V T-Zell Medium

(Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien) eingestellt und anschließend für die Experimente ausgesät.

2.4.2 T-Zell-Stimulation

Zur Stimulation wurden die T-Zellen in 96-Well Zellkulturplatten ausgesät. Diese wurden vor Beginn des Experiments über Nacht mit CD3-Antikörper (BioLegend 100238, Klon 17A2) beschichtet. Dazu wurden pro Well 100 µL der Antikörperlösung (1 µg/mL in PBS) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde der Antikörper abgesaugt und die Platte mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 125 µL Zellsuspension (entsprechend 750.000 Zellen) in jedes Well gegeben. Dazu wurden 125 µL einer Lösung eines CD28-Antikörpers (BioLegend 102116, Klon 37.51, Konzentration 10 µg/mL) gegeben, um eine Endkonzentration von 5 µg/mL zu erreichen. Für die unstimulierten Kontrollen wurde weder CD3- noch CD28-Antikörper verwendet. Hier wurden die Wells über Nacht mit PBS gefüllt und anstelle des CD28-Antikörpers 125 µL AIM-V Medium zugegeben.

Neben diesen Bedingungen, die für die Kultivierung der Zellen zur Untersuchung der mRNA Expression von T-Zell-Rezeptoren nach Stimulation in WT-Zellen verwendet wurden, wurden für die Untersuchung der Expression von *Il2* und *Ifnγ* in WT und *Has3* KO Zellen zwei weitere Bedingungen ergänzt. Hierzu wurden zusätzlich zur Antikörperkonzentration 1 µg/mL / 5 µg/mL (CD3/CD28) noch die Konzentrationen 0,2 µg/mL / 1 µg/mL und 0,04 µg/mL / 0,2 µg/mL verwendet.

Die Zellen wurden für vier Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 200 µL Medium abgenommen und für 5 Minuten bei 15.700 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für spätere Analysen bei -20°C gelagert. Anschließend wurden pro Well 250 µL AIM-V Medium zugegeben, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren gelöst und die Suspension in ein Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß (Eppi) überführt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 800 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen für die spätere RNA-Isolation in 350 µL RLT-Puffer mit 1 % 2-Mercaptoethanol aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bis zur RNA-Isolation bei -80°C.

2.4.3 Immunozytochemische Färbung der perizellulären HA und CD44

Für die Immunozytochemie wurden 4-Kammer-Kultur-Objektträger (BD) verwendet. Diese wurden für zwei Stunden mit Kollagen (100 µg/mL in Wasser) beschichtet und anschließend über Nacht bei 4°C mit einer CD3-Antikörper-Lösung (1 µg/mL) inkubiert. Vor Aussaat der Zellen wurde die Antikörperlösung abgesaugt und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 225 µL AIM-V Medium pro Kammer vorgelegt und 25 µL T-Zell-Suspension (entsprechend 150.000 Zellen) zugegeben. Zur Aktivierung wurden anschließend noch 250 µL eines CD28-Antikörpers (10 µg/mL) hinzugefügt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen, bei denen nicht mit dem CD3-Antikörper beschichtet wurde und kein CD28-Antikörper zugegeben wurde. Anstelle des CD28-Antikörpers wurden 250 µL AIM-V Medium zugegeben. Die Zellen wurden für 4h bzw. 24h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubationszeit erfolgte die Fixierung der Zellen mittels Fixierlösung (3,7 % Formaldehyd, 5 % Eisessig, 70 % Ethanol in PBS). Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und zwei Mal kurz mit PBS gewaschen. Dann wurden 500 µL Fixierlösung pro Kammer zugegeben und für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erst einmal kurz und dann zwei Mal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Negativkontrollen wurden für 30 Minuten bei 37°C mit 4 U/mL Hyaluronidase (Sigma, H1136) behandelt. Anschließend wurde für eine Stunde mit einer Lösung von 5 % BSA in PBS bei RT geblockt und mit biotinyliertem HAbP (siehe Tabelle 6, 1:375 in PBS mit 1 % BSA) und Kaninchen anti-CD44 Antikörper (siehe Tabelle 6, 1:500 in PBS mit 1 % BSA) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde drei Mal mit PBS gewaschen und dann für eine Stunde bei RT mit Streptavidin Cy3 und Ziege anti-Kaninchen AF647 (siehe Tabelle 6, beide 1:400 in PBS) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit *Roti®Mount FluorCare DAPI* eingedeckt.

2.5 Genexpressionsanalyse mit quantitativer *Realtime*-PCR

Zur Untersuchung der Genexpression von *Has3*, *Nppa* und *Nppb* wurde die transkribierte *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) mittels quantitativer *realtime* Polymerasenkettenreaktion (qPCR) untersucht.

2.5.1 RNA-Isolation aus frischem Gewebe

Bei der Gewinnung der Gewebe aus der Maus wurden diese unmittelbar in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, um eine mRNA-Degradation zu vermeiden. Zur RNA Extraktion wurden die Gewebe dann zusammen mit PeqGOLD TriFast (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) in gentleMACS M-Röhrchen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gegeben und mithilfe eines gentleMACS *dissociators* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) aufgeschlossen. Das Lysat wurde in Eppis überführt und im Verhältnis 1:1 mit Chloroform versetzt, vermischt und anschließend 10 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde entnommen und für die weitere Extraktion 1:1 mit Isopropanol vermischt. Hierbei wurde strikt auf die Vermeidung von Verunreinigungen in Form von Verschleppung der unteren Phase geachtet. Anschließend wurde zur Fällung der RNA eine Stunde bei 4°C und 16.000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde zum Waschen in Ethanol 80 % (V/V) aufgenommen und wiederum für 10 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgesaugt und das Pellet zur Entfernung des Restalkohols kurz bei 65°C inkubiert. Abschließend wurde das Pellet in RNase-freiem Wasser gelöst und hierzu 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Zur Quantifizierung der erhaltenen RNA und ihrer Reinheitsbestimmung wurde die Lösung an einem NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) vermessen und die Absorption der Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt. Anschließend wurde die RNA bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.5.2 RNA-Isolation aus formalinfixiertem paraffineingebettetem Gewebe

Zur Isolation von RNA aus formalinfixiertem paraffineingebettetem (FFPE) Gewebe wurde das *PureLink™ FFPE RNA Isolation Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Die Anwendung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Hierzu wurden zunächst Gewebeschnitte aus dem nicht-infarzierten Bereich des Herzens gewonnen. Diese wurden in RNase-freien Mikroreaktionsgefäßen mit Schmelzpuffer versetzt. Dann wurde zum Aufschmelzen des Paraffins 10 Minuten bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde Proteinase K zugegeben und für 60 Minuten bei 60°C inkubiert, um das Gewebe zu lysieren. Unmittelbar danach wurde eine Minute bei 16.000 x g zentrifugiert, wodurch sich eine Paraffinschicht auf dem Lysat bildete. Diese wurde penetriert und das darunter liegende Lysat in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Hier wurden Bindepuffer und Ethanol 100 % dazugegeben und gemischt. Das Gemisch wurde über eine Säule

gegeben und diese bei 800 x *g* für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Gewinnung der RNA von der Säule wurde mit RNase-freiem Wasser eluiert.

2.5.3 RNA-Isolation aus kultivierten T-Zellen

Die Isolation der RNA aus den isolierten und stimulierten T-Zellen erfolgte mit dem *RNeasy mini kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerprotokoll. Als Ausgangspunkt dienten die, in 350 µL RLT-Puffer lysierten T-Zellen. Diesen wurden 350 µL Ethanol 70 % zugegeben und die Mischung auf die Säule gegeben. Anschließend wurde 30 Sekunden bei 10.000 x *g* zentrifugiert. Die Säule wurde erst mit 700 µL RW1 Puffer, dann zwei Mal mit 500 µL RPE Puffer gewaschen und nach den ersten beiden Waschschritten für 30 Sekunden, nach dem dritten 2 Minuten, bei 10.000 x *g* zentrifugiert. Zum Trocknen der Membran wurde eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zum Eluieren der RNA von der Säule wurden 50 µL RNase-freies Wasser über die Säule gegeben und eine Minute bei 10.000 x *g* zentrifugiert. Das Eluat wurde nochmals über die Säule gegeben und erneut zentrifugiert.

Im Anschluss erfolgte eine Aufreinigung und Konzentrierung der RNA mit dem *RNA Clean & Concentrator-25 kit* (Zymo Research, Freiburg, Deutschland) gemäß Herstellerprotokoll. Dabei wurden zum Eluat aus der vorherigen Isolation zunächst 100 µL RNA Bindungs-Puffer und 150 µL Ethanol 100 % gegeben. Die Mischung wurde auf die Säule gegeben und 30 Sekunden bei 10.000 x *g* zentrifugiert. Anschließend wurde erst 400 µL RNA Prep Puffer, dann 700 µL RNA Wasch-Puffer und 400 µL RNA Wasch-Puffer über die Säule gegeben und nach den ersten beiden Schritten 30 Sekunden, nach dem letzten eine Minute bei 10.000 x *g* zentrifugiert. Abschließend wurde mit 15 µL RNase-freiem Wasser die RNA von der Säule eluiert.

2.5.4 cDNA-Synthese

Zur reversen Transkription der RNA in cDNA wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerprotokoll verwendet. Hierzu wurde 1 µg RNA zur Entfernung genomischer DNA zunächst für 2 Minuten bei 42°C mit *gDNA wipeout buffer* inkubiert. Anschließend wurde ein Mastermix, bestehend aus Puffer, reverser Transkriptase und einem Primer Mix, zugegeben, für 15 Minuten bei 42°C inkubiert und anschließend die reverse Transkriptase durch 3-minütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert. Die cDNA wurde bis zur Durchführung der quantitativen Polymerasenkettenreaktion (qPCR) bei -20°C aufbewahrt.

2.5.5 Quantitative Realtime-PCR

Für die qPCR wurde *Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG* (Life Technologies, Eugene, OR, USA) und ein *StepOnePlus™-Real-Time-PCR System* (Life Technologies, Eugene, OR, USA) verwendet. Für die Reaktion wurde eine Mischung aus Polymerase, SYBR™ Green, dNTP und Puffer gemeinsam mit cDNA und den entsprechenden *Primern* (Konzentration je 0,625 µM) eingesetzt. Alle Proben wurden als Duplikate vermessen. Die relative Genexpression wurde mit Hilfe der korrigierten $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Methode und 18S bzw. *Hprt* als interner Kontrolle ermittelt. Die Sequenzen der verwendeten Primer können Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer in der quantitativen *realtime*-PCR

Gen-symbol	Vorwärts-Primer 5' → 3'	Rückwärts-Primer 5' → 3'
<i>Rn18s</i>	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
<i>Hprt</i>	ACAGGCCAGACTTTGTTGGAT	ACTTGCGCTCATCTTAGGCTT
<i>Has3</i>	CTCAGTGGACTACATCCAGG	GACATCTCCTCCAACACCTC
<i>Nppa</i>	ACAGATCTGATGGATTTCAAGAAC CTGC	AGTGCGGCCCTGCTTCCTCA
<i>Nppb</i>	GGATCGGATCCGTCAGTCGTT	AGACCCAGGCAGAGTCAGAAA

Abweichend vom beschriebenen Vorgehen wurde für die Untersuchung der HAS-, HA-Rezeptoren- und Cytokin/Chemokin-Expression der kultivierten T-Zellen eine Taqman-PCR durchgeführt. Dazu wurden die in Tabelle 4 angegebenen Sonden zusammen mit *Taqman Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) in einem *StepOnePlus™-Real-Time-PCR System* genutzt. Dabei wurden die endogene Kontrolle und das Zielgen in derselben Reaktionskammer der Platte detektiert. Dazu waren die Sonden der endogenen Kontrolle und des Zielgens mit unterschiedlichen Fluorescein-Derivaten (FAM und VIC) markiert. Für die Reaktion wurde eine Mischung aus Mastermix, Sonden und cDNA eingesetzt. Alle Proben wurden als Triplikate vermessen. Die relative Genexpression wurde mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Methode und 18S als interner Kontrolle ermittelt.

Tabelle 4: verwendete Taqman Sonden

Gensymbol	Taqman Katalognummer
<i>18s</i>	Hs03003631_g1
<i>Il2</i>	Mm00434256_m1
<i>Ifny</i>	Mm01168134_m1
<i>Has1</i>	Mm03048195_m1
<i>Has2</i>	Mm00515089_m1
<i>Has3</i>	Mm00515092_m1
<i>Hmnr</i>	Mm00469183_m1
<i>Cd44</i>	Mm01277164_m1
<i>Stab1</i>	Mm00460390_m1
<i>Stab2</i>	Mm00454684_m1
<i>Lyve1</i>	Mm01280692_m1
<i>Susd5</i>	Mm01250014_m1

2.6 Histologische Analysen

Nach Ablauf der Reperfusionzeiten wurden die Tiere schmerzfrei getötet. Das Blut wurde durch Punktion des rechten Vorhofs entnommen und anschließend das Herz aus dem Thorax entfernt. Das Herz wurde zur Befreiung von verbleibendem Blut mit DPBS durchspült und dann zur Gewebefixierung für 24 h bei 4°C in einer 4 % Formaldehydlösung (ROTI® Histofix 4 %, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) belassen. Anschließend wurden die Herzen in DPBS überführt, über eine aufsteigende Ethanolreihe und Roticlear® (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) entwässert und in Paraffin eingebettet. Die eingebetteten Herzen wurden mit einem Rotationsmikrotom (RM2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) geschnitten. Dabei wurde eine Schnittdicke von 5 µm gewählt. Jedes Herz wurde in zehn jeweils 100 µm umfassende

Ebenen geschnitten, wobei die erste Ebene am Apex begonnen wurde. Zwischen den Ebenen wurden immer 250 µm verworfen. Die erhaltenen Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und am Folgetag für 60 Minuten bei 60°C hitzefixiert.

Vor Beginn der immunhistochemischen Färbungen (2.6.3 – 2.6.10) wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydratisiert. Hierzu wurde erst drei Mal für 15 Minuten in Roticlear® und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe je 2 Minuten in Ethanol absolut, 96 % und 70 % inkubiert. Danach wurde zwei Mal 5 Minuten in DPBS gewaschen. Als weitere vorbereitende Schritte erfolgten eine Antigen-Demaskierung (*heat-induced epitope retrieval* (HIER)) in Citratpuffer (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) bei pH 6 für 20 Minuten, bei dem die, durch die Fixierung quervernetzten, Antigene wieder freigesetzt wurden, und eine Blockierung mit Blockierlösung (siehe Tabelle 5) für eine Stunde. Dazwischen wurde zwei Mal für 5 Minuten in DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit Antikörpern, die in den folgenden Unterkapiteln beschrieben sind. Grundsätzlich wurde mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert, während der Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur angewendet wurde. Die immunhistochemischen Färbungen wurden am Ende mit *ROTI®Mount FluorCare DAPI* (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt. Abweichungen von diesem Vorgehen werden in den einzelnen Färbungen beschrieben. Eine Liste der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 5 zu finden. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Die Aufnahme der mikroskopischen Bilder erfolgte mit einem Zeiss AxioObserver.Z1 Mikroskop mit der Software Zen 2 (beide Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Die Auswertung erfolgte über die Softwares ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA), Diskus view (Hilgers Technisches Büro, Königswinter, Deutschland) und Zen 2.

Tabelle 5: Nicht-kommerzielle verwendete Lösungen für histologische Färbungen

Lösung	Zusammensetzung
Blockierlösung	20 mM Tris 137 mM NaCl 10 % (V/V) FCS 1 % (m/V) BSA
Gomori Färbelösung	0,4 % (m/V) Chromotrop 2 R 0,3 % (m/V) Anilinblau 1 % (V/V) Eisessig 0,8 % Phosphorwolframsäure in destilliertem Wasser
Celestine Blau Lösung	5 % (m/V) $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 % (m/V) Celestine Blau 14 % (V/V) Glycerol in destilliertem Wasser
Picrosiriusrot Lösung	0,1 % (m/V) Siriusrot in gesättigter Pikrinsäurelösung

Tabelle 6: Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie/Immunzytochemie

Antikörper	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
Ratte anti-MAC-2	1:200	CL8942AP	Cedarlane, Burlington, Kanada
Ziege anti-Ratte, Rhodamine Red TM -X konjugiert	1:200	112-295-167	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Großbritannien
Biotinyliertes HAbP	1:150	385911	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin, Cy3 konjugiert	1:200	SA1010	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ziege anti-Kaninchen, AF647 konjugiert	1:200	A-21245	Life Technologies, Eugene, OR, USA

Kaninchen anti-CD68	1:1000	ab125212	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Kaninchen anti-POSTN	1:100	ab14041	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Kaninchen anti-CTHRC1	1:25	MABT889	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Kaninchen anti- α -SMA	1:200	ab5694	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Kaninchen anti-VIM	1:200	ab9294	Abcam, Cambridge, Großbritannien
WGA, AF488 konjugiert	1:200 (5 μ g/mL)	W11261	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Kaninchen anti-CD44	1:500	ab157107	Abcam, Cambridge, Großbritannien

2.6.1 Gomori Trichrom Färbung

Alle zehn Ebenen der Herzen wurden nach Gomori gefärbt. Bei dieser *Gomori Trichrom* Färbung werden Muskelfasern rot dargestellt, während Zellkerne schwarz und kollagenhaltige Matrix blau erscheinen. Für die Färbung wurde zunächst entparaffiniert und rehydratisiert. Hierzu wurde erst zwei Mal für 15 Minuten in Roticlear® inkubiert, anschließend je 5 Minuten zwei Mal in Ethanol absolut, dann in Ethanol 96 %, Ethanol 70 % und destilliertem Wasser inkubiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation in Bouin's Lösung (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) bei 58°C im Wasserbad. Anschließend wurde für 5 Minuten mit fließendem Leitungswasser gespült, für 5 Minuten in Weigert's Eisenhämatoxylin Lösung (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) gefärbt und wiederum 5 Minuten mit Leitungswasser gespült. Es folgte eine 25-minütige Inkubation in Gomori Färbelösung (siehe Tabelle 5), in deren Anschluss kurz mit Leitungswasser gewaschen wurde, ehe für zwei Mal 2 Minuten die Differenzierung in 0,5 % Essigsäure erfolgte. Abschließend wurden die Schnitte noch über Ethanol 70 %, Ethanol 69 %, zwei

Mal Ethanol absolut und zwei Mal Roticlear® jeweils für 2 Minuten entwässert und dann mit ROTI®Mount Eindeckmedium eingedeckt. Die Auswertung erfolgte in Diskus view.

2.6.2 Picrosiriusrot Färbung

Für die Anfärbung von Kollagen mit Picrosiriusrot wurden die Schnitte zunächst, wie in 2.6 beschrieben, entparaffiniert und rehydratisiert. Nach dem Waschen in DPBS wurde eine Minute in destilliertem Wasser und dann 7 Minuten in Celestine Blau Lösung (siehe Tabelle 5) inkubiert. Anschließend wurde durch kurzes Eintauchen in 1 % Salzsäure differenziert und die Schnitte für 5 Minuten in Leitungswasser gebläut. Dann wurde in die Picrosiriusrot Färbelösung (siehe Tabelle 5) überführt und 30 Minuten gefärbt. Abschließend wurde über Ethanol 70 %, Ethanol 96 %, Ethanol absolut (je 2 Minuten) und Roticlear® (5 Minuten) entwässert und mit ROTI®Mount eingedeckt. Es wurden Mikroskopbilder sowohl mit einfachem Durchlicht als auch mit polarisiertem Licht aufgenommen. Die Auswertung erfolgte in ImageJ.

2.6.2.1 Durchlichtmikroskopie

Es wurden Durchlichtaufnahmen der Schnitte angefertigt. Hierbei stellt sich gesundes Gewebe gelb dar, während Kollagen rot angefärbt ist.

2.6.2.2 Polarisationsmikroskopie

Die Schnitte wurden ebenfalls in linear polarisiertem Licht aufgenommen. Hierbei kommt die Eigenschaft der Doppelbrechung von Siriusrot zum Tragen. Im polarisierten Licht erscheinen lose gepackte Kollagenfasern grün, während dicht gepackte Fasern rot sind.

2.6.3 MAC-2 Färbung

Für die Färbung von Makrophagen wurde ein Antikörper gegen Galektin 3 (MAC-2) (Cedarlane, Burlington, Kanada) aus der Ratte verwendet. Die Detektion erfolgte über einen Rhodamine Red™-X konjugierten Ziege anti-Ratte Zweitantikörper (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Großbritannien).

2.6.4 CD68 Färbung

Für die Makrophagenfärbung wurde neben MAC-2 auch CD68 als Antigen verwendet. Hierfür wurde mit einem Kaninchen anti-CD68 Antikörper (Abcam, Cambridge, Großbritannien) gefärbt, der anschließend mit einem AF647-konjugierten Ziege anti-Kaninchen Zweitantikörper detektiert wurde.

2.6.5 Hyaluronsäure Färbung

Für die Färbung von HA im Gewebe wurde kein Antikörper, sondern HA-bindendes Protein (HAbP) verwendet. Hierzu wurde nach der Antigen-Demaskierung zwei Mal 5 Minuten mit DPBS gewaschen und anschließend das endogene Biotin durch jeweils 10-minütige Inkubation mit erst Avidin und dann Biotin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) geblockt. Anschließend wurde zwei Mal mit DPBS gewaschen und für eine Stunde in Blockierlösung inkubiert. Dann erfolgte die Färbung mit biotinyliertem HAbP. Zur Detektion wurde Cy3-konjugiertes Streptavidin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet.

2.6.6 Periostin Färbung

Zur Detektion aktivierter Fibroblasten wurde u.a. eine Färbung von Periostin (POSTN) durchgeführt. Als Erstantikörper wurde ein anti-POSTN Antikörper aus dem Kaninchen (Abcam, Cambridge, Großbritannien) verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein AF647-konjugierter Ziege anti-Kaninchen Antikörper benutzt.

2.6.7 CTHRC1 Färbung

Ein weiterer Marker aktivierter Fibroblasten ist *Collagen triple helix repeat-containing protein 1* (CTHRC1). Dieser wurde über einen Kaninchen anti-CTHRC1 Erstantikörper (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) gefärbt und mit einem AF647-konjugierten Ziege anti-Kaninchen Antikörper detektiert.

2.6.8 α -SMA Färbung

Als dritter Marker für aktivierte Fibroblasten wurde α -glattes Muskelaktin (α -SMA) verwendet. Dieses wurde über einen Kaninchen anti- α -SMA Erstantikörper gebunden und anschließend mit einem AF647-konjugierten Ziege anti-Kaninchen Antikörper angefärbt.

2.6.9 Vimentin Färbung

Als globaler Fibroblastenmarker wurde Vimentin (VIM) verwendet. Hierzu wurden die Schnitte erst mit Kaninchen anti-VIM Antikörpern (Abcam, Cambridge, Großbritannien) aus dem Kaninchen inkubiert und anschließend mit AF647-konjugierten Ziege anti-Kaninchen Zweitantikörpern.

2.6.10 WGA Färbung

Zur Bestimmung der Kardiomyozytengröße wurde die Zellmembran mit AF488-markiertem Weizenkeimagglutinin (WGA) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) gefärbt, das an Sialinsäure und N-Acetylglucosamin bindet. Hierzu wurde zunächst drei Mal 5 Minuten in Roticlear®, dann je 4 Minuten in Ethanol absolut, Ethanol 96 % und Ethanol 70 % und abschließend zwei Mal 5 Minuten in DPBS inkubiert. Anschließend folgten die Antigen-Demaskierung und zweimaliges Waschen in DPBS. Danach wurde für 30 Minuten bei 37°C mit AF488-konjugiertem WGA inkubiert und nach zwei Waschschritten mit *ROTI®Mount FluorCare DAPI* eingedeckt. Zur Auswertung wurde die Fläche ausgewählter runder Kardiomyozyten mit sichtbarem Zellkern in ImageJ bestimmt.

2.7 Statistik

Die statistischen Analysen wurden in der Software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. In allen Datensätzen wurde der Grubb Ausreißer Test durchgeführt ($\alpha = 0,05$) und statistische Ausreißer von der Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurden alle Datensätze mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Beim Vergleich zweier normalverteilter homoskedastischer Gruppen wurde ein ungepaarter zweiseitiger t-Test angewendet. Bei Heteroskedastizität wurde eine Welsh Korrektur durchgeführt. Nicht normalverteilte Datensätze wurden mit dem Mann-Whitney-Test analysiert. Zur Auswertung von mehr als zwei Experimentalgruppen wurde eine Varianzanalyse mittels *OneWay ANOVA* durchgeführt. Zum Vergleich mehrerer Gruppen über einen Zeitverlauf wurde die *TwoWay ANOVA* verwendet. Bei allen Tests wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Bei den angegebenen n-Zahlen repräsentiert jedes n ein einzelnes Tier bzw. Gewebe.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung des *Has3* Knockouts

Zur Validierung des verwendeten Tiermodells und zum Nachweis einer ausreichenden Defizienz von *Has3* wurden 72 h nach I/R die Vorhöfe sowie die Blasen der Tiere entnommen. Dabei wurden die Vorhöfe gewählt, um die Expression im Herzen nachzuweisen. Die Blase wurde untersucht, da in ihr, abgesehen vom zentralen Nervensystem, die höchste Expression von *Has3* detektiert wurde.¹⁴¹ Es zeigte sich sowohl im Herz als auch in der Blase eine massiv verminderte Expression von *Has3* mRNA (siehe Abbildung 6). In zwei (Abbildung 6 A) bzw. drei (Abbildung 6 B) Fällen war in den defizienten Tieren keine *Has3* mRNA mehr nachweisbar.

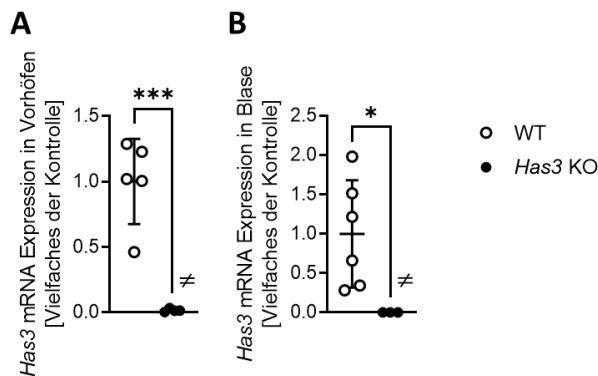


Abbildung 6: mRNA Expression von *Has3* in Vorhöfen und Blase.

Die Vorhöfe und Blasen wurden 72 h nach Infarkt aus *Has3*-defizienten Mäusen (*Has3* KO) und Wildtyptieren (WT) entnommen. **A.** Quantifizierung von *Has3* im Vorhof als Vielfaches der Kontrolle. **B.** Quantifizierung von *Has3* in der Blase als Vielfaches der Kontrolle. # symbolisiert 2 (A) bzw. 3 (B) Tiere unter der Nachweisgrenze. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=5-6, 3-6; *p<0,05, ***p<0,001.

3.2 Einfluss der HAS3 auf die kardiale HA-Matrix

Neben der Expression von *Has3* wurde auch die HA-Matrix auf Unterschiede zwischen den Genotypen untersucht. Hierzu wurden Schnitte von Herzen 72 h nach Infarkt gefärbt. Zur Visualisierung von HA wurde HA bindendes Protein (HAbP) verwendet. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Ausbildung der HA-Matrix nach Infarkt (siehe Abbildung 7). Allerdings ist auch bekannt, dass HAS2 die vorherrschende Isoform im Herzen ist und HAS3 eine untergeordnete Rolle spielt.⁹³

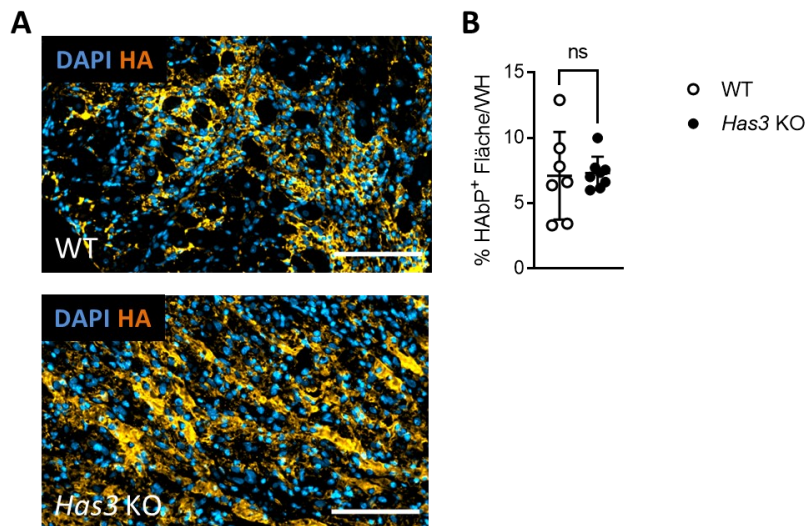


Abbildung 7: Immunhistochemische Bestimmung von HA in Herzgewebe 72 h nach Infarkt. Die HA Menge in Herzschnitten wurde mit Hilfe von HA bindendem Protein (HAbP) bestimmt. **A.** Repräsentative Bilder der HA-gefärbten Schnitte in *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) und den zugehörigen WT-Tieren (WT). **B.** Quantifizierung der durch HAbP angefärbten Fläche im gesamten Herzen (WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=6, 8.

3.3 Analyse der Narbenbildung und Herzfunktion

3.3.1 Histologische Bestimmung von Narbengröße und Kollagendichte drei Wochen nach Infarkt

Zu Beginn des Projektes wurde zunächst der Einfluss der *Has3*-Defizienz auf den funktionellen Infarktphänotyp und die Narbenbildung untersucht. Für die Untersuchung wurde, wie auch in den Studien zu *Has1*- und *Has2*-defizienten Tieren,¹³⁴ der Zeitpunkt drei Wochen nach Infarkt gewählt. Es zeigte sich eine signifikant größere Narbe in den *Has3*-defizienten Tieren; sowohl bezogen auf den linken Ventrikel als auch bezogen auf das gesamte Herz (siehe Abbildung 8).

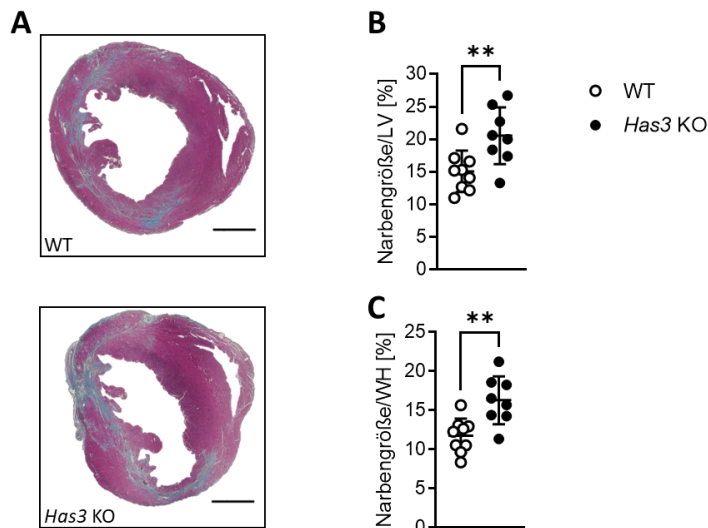


Abbildung 8: Bestimmung der Narbengröße in Gomori gefärbten Herzen 3 Wochen nach Infarkt.

Herzen von *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) und Wildtypen (WT) wurden 3 Wochen nach Infarkt nach Gomori gefärbt und die Narbengröße ermittelt. Histologisch erscheint Narbengewebe blau-grau, während gesundes Gewebe rot gefärbt ist. **A.** Repräsentative Bilder der Gomori gefärbten Herzen. **B.** Quantifizierung der Narbengröße als Mittelwert der Messung von zehn Ebenen, angegeben als Flächenprozent des linken Ventrikels (LV) und **C.** des gesamten Herzens (WH). Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9, 8; **p<0,01.

Neben der Gomori Trichrom Färbung wurde auch noch eine spezifische Kollagen-Färbung mit Pikrosirius-Rot durchgeführt. Dieser Farbstoff lagert sich aufgrund seiner linearen und negativen Struktur an Kollagenfasern an. In der Färbung heben sich diese rot vom gelben Hintergrund ab (siehe Abbildung 9 A). Nachdem für die Gomori Trichrom Färbung eine manuelle Auswertung von Hand in der Software Diskus view vorgenommen wurde, wurde die Pikrosirius-Rot Färbung automatisiert mittels ImageJ ausgewertet. So ließen sich mit einer zweiten Methode die Effekte in der Narbengröße bestätigen. Denn auch diese Färbung zeigte signifikant größere kollagenhaltige Narben bezogen auf linken Ventrikel und gesamtes Herz (siehe Abbildung 9).

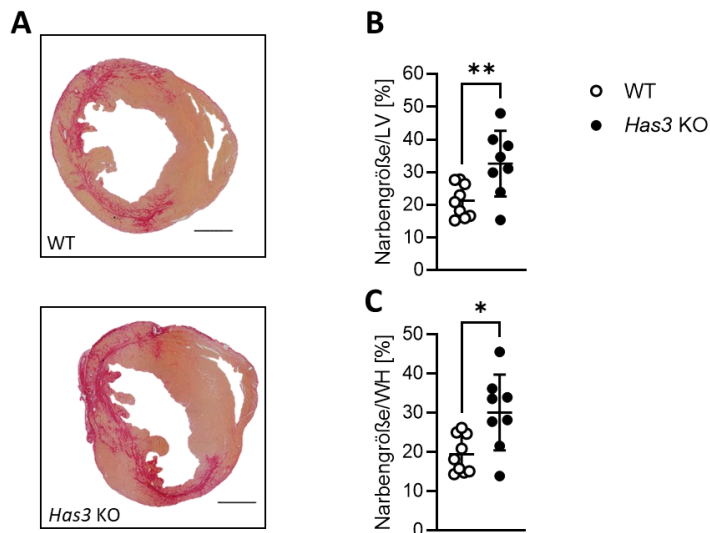


Abbildung 9: Narbengrößenbestimmung in Pikrosirius-Rot gefärbten Herzen 3 Wochen nach Infarkt.

In Herzen von *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) und Wildtyptieren (WT) wurde 3 Wochen nach Infarkt das Kollagen mit Pikrosirius-Rot angefärbt und die Narbengröße in ImageJ bestimmt. Kollagen ist rot angefärbt, während gesundes Gewebe gelb im Hintergrund zu sehen ist. **A.** Repräsentative Bilder der Pikrosirius-Rot gefärbten Herzen. **B.** Quantifizierung der Narbengröße als Mittelwert der Messung von zehn Ebenen, angegeben als Flächenprozent des linken Ventrikels (LV) und **C.** des gesamten Herzens (WH). Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9, 8; *p<0,05, **p<0,01.

Die Pikrosirius-Rot Färbung gibt darüber hinaus noch die Möglichkeit der Beurteilung der Packungsdichte der Kollagenfasern. Hierzu müssen die gefärbten Schnitte in linear polarisiertem Licht betrachtet werden. Durch die Färbung wird die optische Anisotropie der Kollagenfasern verstärkt. So zeigen sich dicht gepackte Fasern in rot, lose gepackte in grün (siehe Abbildung 10 A). Für die Auswertung wurde das Verhältnis von roter zu grüner Färbung betrachtet. Je größer das Verhältnis, desto dichter ist das Kollagen gepackt. Hier zeigten sich keine Unterschiede (siehe Abbildung 10).

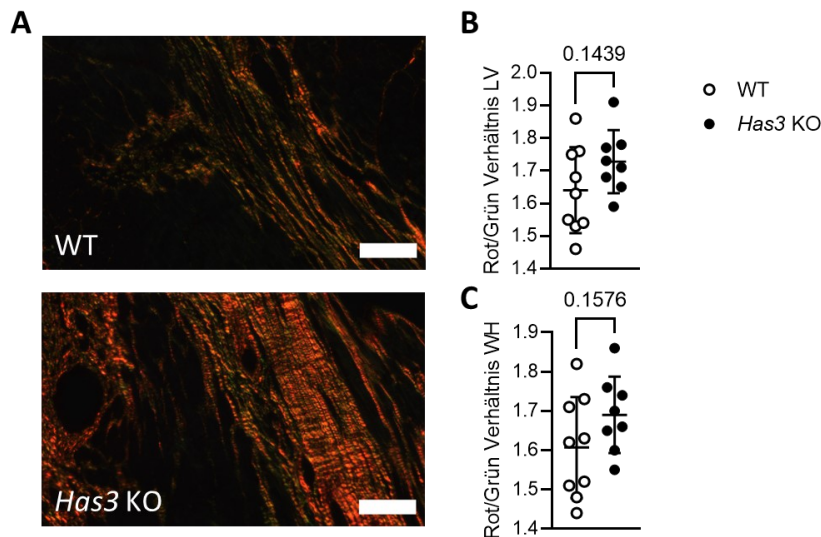


Abbildung 10: Bestimmung der Kollagendichte in Pikrosirius-Rot gefärbten Herzen 3 Wochen nach Infarkt.

Pikrosirius-Rot gefärbte Herzen von *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) und Wildtypieren (WT) wurden 3 Wochen nach Infarkt in linear polarisiertem Licht untersucht. Dicht gepackte Kollagenfasern sind rot, lose gepackte grün. Das Rot/Grün Verhältnis ist dargestellt. **A.** Repräsentative Nahaufnahmen des Narbenbereichs der Pikrosirius-Rot gefärbten Herzen. **B.** Verhältnis von roter zu grüner Färbung als Mittelwert der Messung von zehn Ebenen, angegeben für den linken Ventrikel (LV) und **C.** das gesamte Herzen (WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9, 8.

3.3.2 Echokardiografie des Herzens zur Bestimmung der Herzfunktion

Neben der histologischen Untersuchung der Herzen erfolgte begleitend auch eine echokardiographische Beurteilung der Herzfunktion. Dazu wurden zunächst im Vorfeld der Vor-OP die basalen Herzparameter erhoben. Weitere Messungen erfolgten 1, 7, 14 und 21 Tage nach Infarktinduktion. Als Hauptzielgrößen wurden die LVEF (siehe Abbildung 11 A) sowie ESV und EDV (siehe Abbildung 11 C, D) bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die *Has3*-defizienten Tieren neben der größeren Narbe auch eine verschlechterte kardiale Funktion aufwiesen. So war in diesen Tieren sowohl 14 Tage als auch 21 Tage nach Infarkt eine signifikant stärkere Einschränkung der LVEF zu erkennen. Damit einhergehend zeigte sich eine vergleichbare Einschränkung des *fractional area change*, der eine zweidimensionale Aussage über die Kontraktionskraft des Herzens liefert. Somit konnte eine verschlechterte Auswurfleistung und Kontraktilität des Herzens gezeigt werden. Daneben ergaben die Messungen erhöhte Volumina im linken Ventrikel, konkret eine Erhöhung des ESV (siehe Abbildung 11). Dies deutete auf eine verstärkte Dilatation des *Has3*-defizienten Herzens hin. Weitere erhobene Parameter wie z.B. die Herzfrequenz zeigten keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

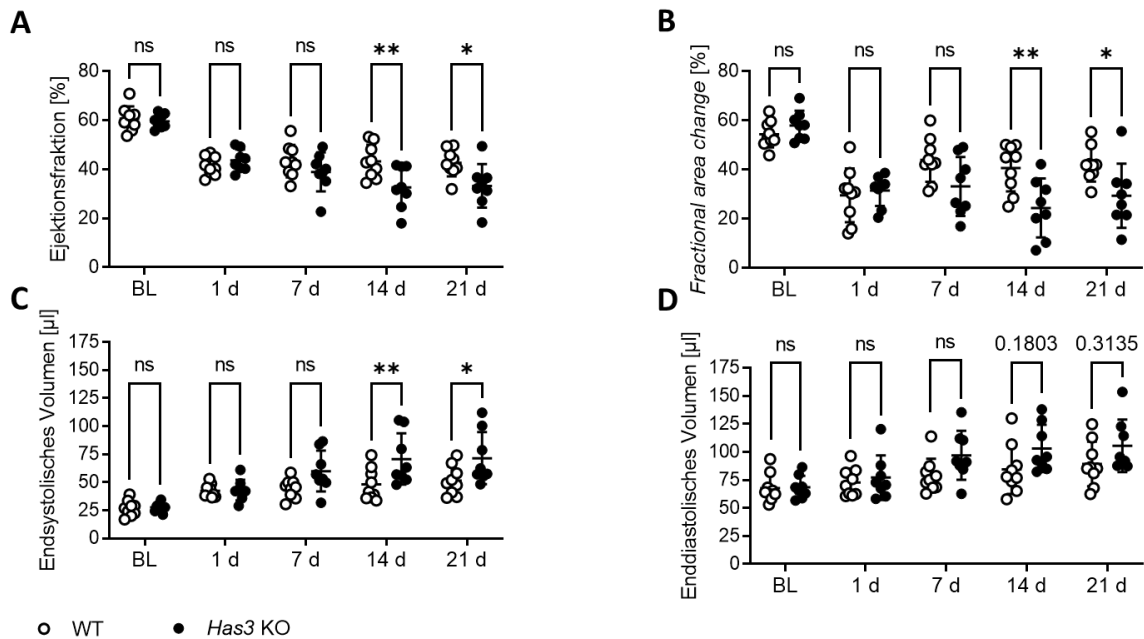


Abbildung 11: Zeitverlauf echokardiographisch bestimmter kardialer Funktionsparameter bis zu 3 Wochen nach Infarkt.

Die Herzfunktion von *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) und Wildtyptieren (WT) wurde basal (BL) und bis zu drei Wochen nach Infarkt untersucht. **A.** Prozentuale Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion. **B.** Prozentuale Bestimmung des *fractional area change*. **C.** Bestimmung des absoluten endsystolischen Volumens im linken Ventrikel. **D.** Bestimmung des absoluten enddiastolischen Volumens im linken Ventrikel. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; $n=9, 8$; * $p<0,05$, ** $p<0,01$. Daten erhoben von Dr. Simone Gorressen.

3.4 Untersuchung der postischämischen Gewebeumbildung

3.4.1 Bestimmung der Herzgewichte

Infolge des Herzinfarktes kommt es zu umfangreichen Änderungen im Herzgewebe. Neben der Ausbildung einer kollagenreichen Narbe im infarzierten Bereich finden auch Veränderungen im verbliebenen gesunden Gewebe statt. Hier kann es bspw. zu einer kompensatorischen Hypertrophie der Kardiomyozyten kommen.¹⁴² Daher wurden im Rahmen der Organentnahme routinemäßig die Herzgewichte aller Tiere bestimmt. Die Gesamtgewichte der Herzen wurden durch Wägung ermittelt und anschließend auf das Körpergewicht normalisiert (siehe Abbildung 12 A). Daneben wurde die Masse des LV auch echokardiographisch ermittelt. Hierbei wurde die Masse des LV rechnerisch erhoben. Anschließend wurde auch diese auf das Körpergewicht normalisiert (siehe Abbildung 12 B). In beiden Methoden konnte beobachtet werden, dass die *Has3*-defizienten Tiere schwerere Herzen bzw. LV haben. Diese Effekte waren erst

21 Tage nach Infarkt zu beobachten, während basal keine Unterschiede vorlagen. Dies ließ eine gesteigerte Hypertrophie in diesen Tieren vermuten.

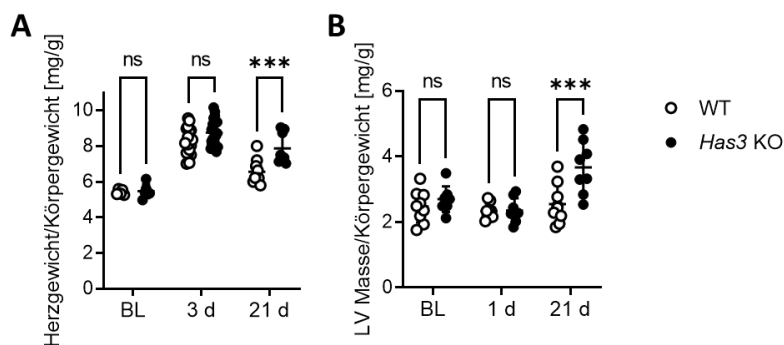


Abbildung 12: Ermittlung der Herzmasse mittels Wägung und Echokardiographie.

Die Masse der Herzen bzw. der linken Ventrikel (LV) *Has3*-defizienter Tiere (*Has3* KO) und von Wildtyptieren (WT) wurden basal (BL) und zu den indizierten Zeitpunkten nach Infarkt durch (A) Wägung und (B) Echokardiographie bestimmt. Die Darstellung erfolgt normalisiert auf das Körpergewicht. **A.** Herzmasse in mg pro g Körpergewicht unter basalen Bedingungen sowie 3 und 21 Tage nach Infarkt. **B.** Linksventrikuläre Masse in mg pro g Körpergewicht unter basalen Bedingungen sowie 1 und 21 Tage nach Infarkt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=5-20, 6-20; ***p<0,001.

3.4.2 Expressionsanalyse natriuretischer Peptide im Herzen

Zur näheren Untersuchung der Ursache der unterschiedlichen Herzgewichte wurde die Expression der natriuretischen Peptide atriales natriuretisches Peptid (ANP) und *brain* natriuretisches Peptid (BNP) im Herzen untersucht. Diese dienen als Hypertrophiemarker im Herzen.¹⁴³ Hierzu wurde Gewebe aus dem nicht-infarzierten *remote* Bereich infarzierter Herzen 21 Tage nach Infarkt zur mRNA-Gewinnung verwendet. Als interne Kontrolle wurde Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (*Hprt*) gewählt, da dieses Gen, anders als z.B. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, auch nach Herzinfarkt keine veränderte Expression zeigt.¹⁴⁴ Die Analyse zeigte, dass in den Herzen *Has3*-defizienter Tiere die Expression von BNP signifikant erhöht war (siehe Abbildung 13).

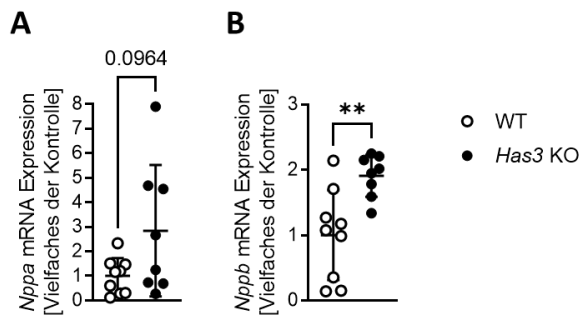


Abbildung 13: Analyse der mRNA Expression natriuretischer Peptide im *remote* Myokard 3 Wochen nach Infarkt.

Die mRNA Expression des atrialen bzw. *brain* natriuretischen Peptids (*Nppa* bzw. *Nppb*) im *remote*-Bereich infarzierter Herzen von *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) und Wildtypieren (WT) wurde 3 Wochen nach Infarkt untersucht. **A.** mRNA Expression von *Nppa*, dargestellt als Vielfaches der Expression in Wildtypieren. $p=0,0964$. **B.** mRNA Expression von *Nppb*, dargestellt als Vielfaches der Expression in Wildtypieren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; $n=9, 8$; $**p<0,01$.

3.4.3 Messung der Kardiomyozytengröße

Im nächsten Schritt wurde die Kardiomyozytengröße histologisch gemessen. Hierzu wurden in Schnitten infarzierter Herzen 3 Wochen nach Infarkt die Zellmembranen der Kardiomyozyten mittels Weizenkeimagglutinin (WGA) angefärbt. Anschließend wurden möglichst runde Kardiomyozyten mit sichtbar mittigem Kern aus dem *remote*-Bereich des linksventrikulären Septums ausgewählt und mittels ImageJ vermessen (siehe Abbildung 14 A). So wurde sichergestellt, dass nur quer angeschnittene Kardiomyozyten in die Messung einbezogen wurden. Die Größenbestimmung erfolgte in acht Ebenen, in denen jeweils 50 Zellen vermessen wurden. Anschließend wurden die Ergebnisse pro Ebene und dann wiederum über alle Ebenen gemittelt, um die durchschnittliche Kardiomyozytenfläche zu erhalten. Hierbei zeigte sich, dass die Kardiomyozyten der *Has3*-defizienten Tiere eine signifikant größere Fläche aufwiesen als die der Wildtypiere (siehe Abbildung 14 B).

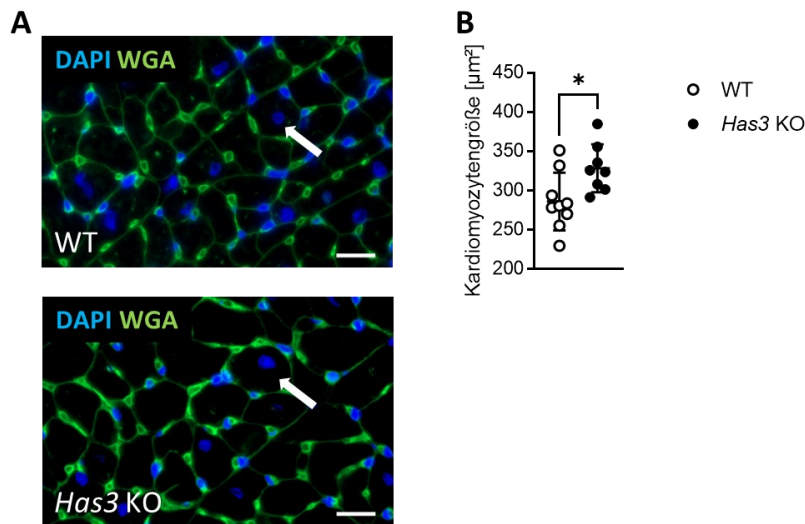


Abbildung 14: Bestimmung der Kardiomyozytengröße in Herzen 3 Wochen nach Infarkt.

In Herzen von *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) und Wildtypieren (WT) wurden die Zellmembranen mit Weizenkeimagglutinin (WGA) angefärbt und anschließend die Fläche der Kardiomyozyten in ImageJ gemessen. **A.** Repräsentative Bilder der WGA gefärbten Herzen. Die Pfeile zeigen exemplarisch gemessene Zellen. **B.** Quantifizierung der Kardiomyozytengröße als Mittelwert aus 8 Ebenen zu je 50 vermessenen Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9, 8; *p<0,05.

Um auszuschließen, dass die Effekte auf die Kardiomyozytengröße bereits basal durch den *Has3* KO entstehen, wurden basale Herzen ebenfalls gefärbt und nach dem gleichen Schema vermessen. Hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen *Has3*-defizienten Mäusen und Wildtypmäusen (Daten nicht gezeigt).

3.5 Einfluss der HAS3 auf die Fibroblastenantwort nach Myokardinfarkt

Fibroblasten spielen eine essenzielle Rolle bei der Narbenbildung infolge des Herzinfarktes. Entsprechend können Veränderungen der Fibroblastenantwort auch zu einer verschlechterten Narbenbildung und einem *Remodeling* des Herzens beitragen. Es konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass HAS2 die Fibroblastenaktivierung beeinflusst.¹³⁴ Auch eine Beeinflussung von Fibroblasten durch T-Zellen wurde beschrieben.¹⁴⁵ Entsprechend war die Analyse der Einflüsse von HAS3 von großem Interesse. Dabei sollten die Fibroblasten sowohl zum Höhepunkt der Proliferation 72 h nach Infarkt als auch zum Höhepunkt der Myofibroblastenaktivierung 7 d nach Infarkt untersucht werden.

3.5.1 Untersuchung der kardialen Fibroblasten 72 h nach Infarkt

Zunächst wurden die Fibroblasten 72 h nach Infarkt histologisch charakterisiert. Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen der Herzen von *Has3*-defizienten Tieren und Wildtyptieren angefertigt, in denen verschiedene Aktivierungsmarker gefärbt wurden. Als Maß für die Zellzahl wurde mithilfe der Software ImageJ der prozentuale Anteil der, für den jeweiligen Marker, positiven Fläche an der Gesamtfläche des Herzschnittes bestimmt. Im ersten Schritt wurde eine VIM-Färbung durchgeführt. Hierdurch wurden neben den Fibroblasten auch sämtliche sonstigen mesenchymalen Zellen angefärbt. In dieser Färbung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden (siehe Abbildung 15).

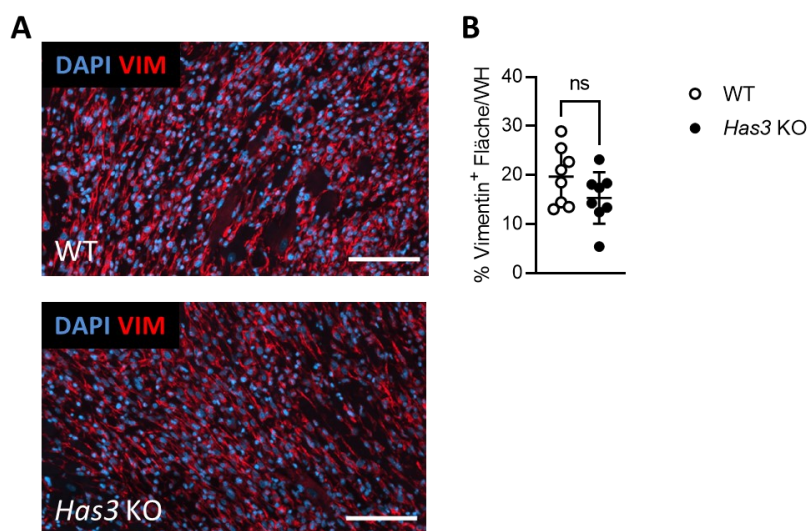


Abbildung 15: Immunhistochemische Bestimmung mesenchymaler Zellen in Herzgewebe 72 h nach Infarkt.

Die Zellen mesenchymalen Ursprungs wurden in Herzschnitten mit Hilfe von Antikörpern gegen VIM immunhistochemisch angefärbt und die positive Fläche in ImageJ quantifiziert. **A.** Repräsentative Bilder der VIM-gefärbten Schnitte in *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) und den zugehörigen Wildtyptieren (WT). **B.** Quantifizierung der VIM-positiven Fläche im gesamten Herzen (WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=8, 8.

Nachdem diese Färbung zunächst keine veränderten Fibroblastenzahlen zeigte, wurden die aktivierten Fibroblasten mittels α -SMA-Färbung quantifiziert. Hierbei konnte in den *Has3*-defizienten Mäusen eine signifikante Reduktion der Myofibroblasten gezeigt werden (siehe Abbildung 16 A, B). Da durch α -SMA neben Myofibroblasten auch glatte Muskelzellen in Blutgefäßen angefärbt werden, wurde noch die Expression der spezifischeren Marker POSTN und CTHRC1 untersucht. In diesen zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen WT und *Has3* KO Tieren. (siehe Abbildung 16 C-F).

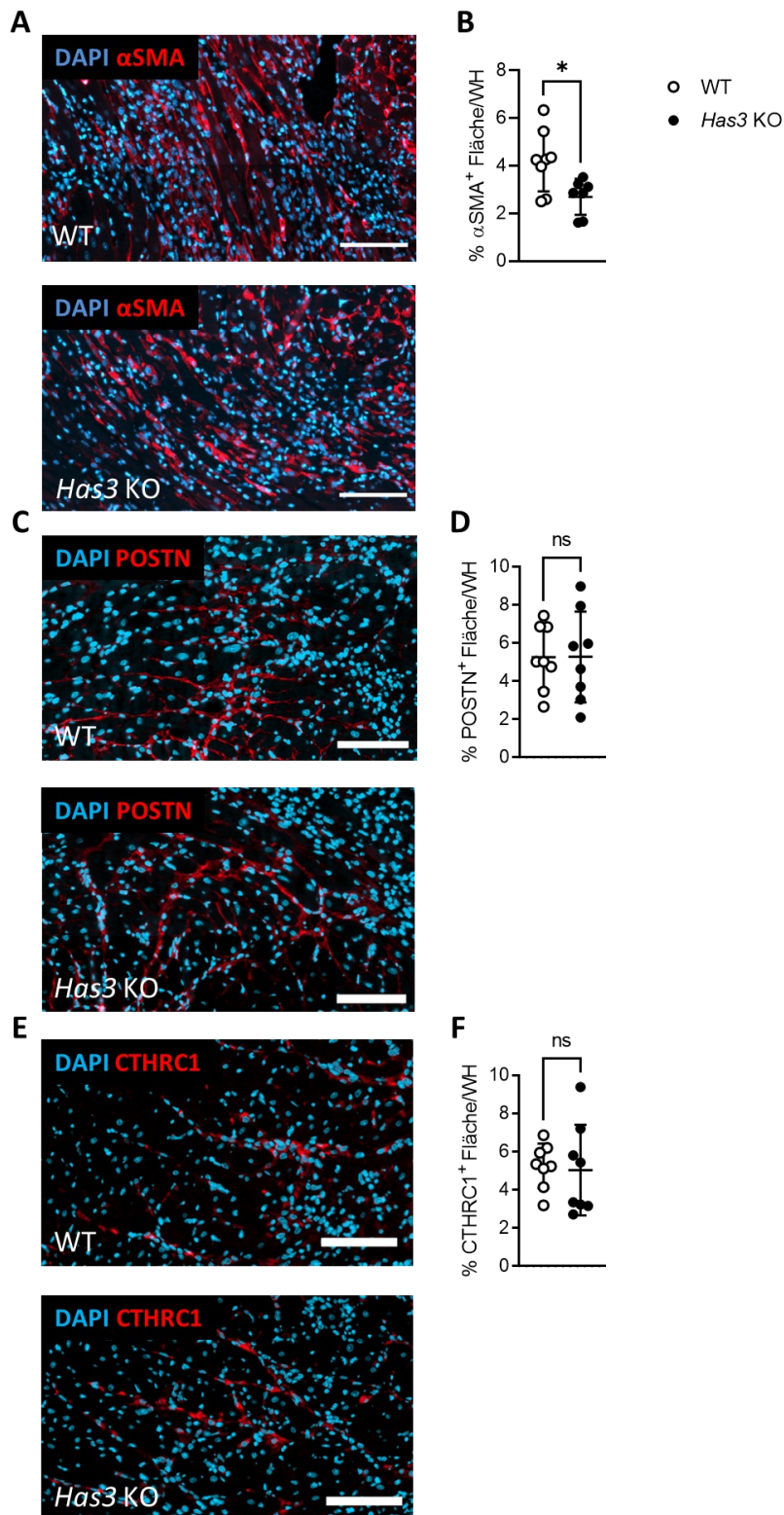


Abbildung 16: Immunhistochemische Bestimmung der Myofibroblasten in Herzgewebe 72 h nach Infarkt.

Die Myofibroblasten wurden in Herzschnitten mithilfe von Antikörpern gegen α -SMA, POSTN und CTHRC1 immunhistochemisch angefärbt und die positive Fläche in ImageJ quantifiziert. A. Repräsentative Bilder der α -SMA-gefärbten Schnitte in *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO)

und den zugehörigen Wildtyp-Tieren (WT). **B.** Quantifizierung der α -SMA-positiven Fläche im gesamten Herzen (WH). **C.** Repräsentative Bilder der POSTN-gefärbten Schnitte in *Has3* KO Tieren und den zugehörigen WT Tieren. **D.** Quantifizierung der POSTN-positiven Fläche im gesamten Herzen. **E.** Repräsentative Bilder der CTHRC1-gefärbten Schnitte. **F.** Quantifizierung der CTHRC1-positiven Fläche im gesamten Herzen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=8, 8; *p<0,05.

Abschließend wurden die Fibroblasten auch durchflusszytometrisch quantifiziert. Dabei wurden diese als CD45⁻, CD31⁻, ITGA7⁻, Feeder⁺ Zellen charakterisiert. Das *Gating*-schema ist in Appendix 4 zu finden. Neben der reinen Quantifizierung wurde auch die Apoptose (Annexin⁺ Zellen) und die Proliferation (BrdU⁺ Zellen) untersucht. Dabei konnten weder Unterschiede in der Fibroblastenzahl pro mg Herzgewebe noch in deren Apoptose oder Proliferation festgestellt werden (siehe Abbildung 17).

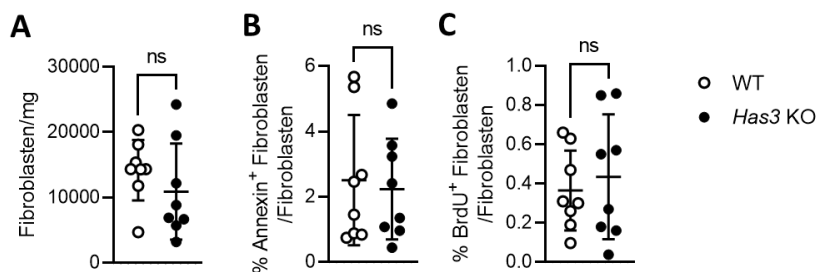


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse der Fibroblasten sowie ihrer Apoptose und Proliferation 72 h nach Infarkt.

Die kardialen Fibroblasten wurden durchflusszytometrisch untersucht, um die Apoptose und Proliferation zu beurteilen. **A.** Anzahl kardialer Fibroblasten (ITGA7⁻, Feeder⁺) pro mg Herzgewebe. **B.** Relativer Anteil apoptotischer Zellen (Annexin⁺) an den Gesamtfibroblasten. **C.** Relativer Anteil proliferativer Zellen (BrdU⁺) an den Gesamtfibroblasten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=8, 8.

3.5.2 Untersuchung der kardialen Fibroblasten 7 d nach Infarkt

Neben dem Zeitpunkt 72 h nach Infarkt wurden die Fibroblasten auch zum Höhepunkt der Myofibroblastenaktivierung 7 d nach Infarkt untersucht. Hierbei wurde, wie auch nach 72 h, zunächst eine Färbung von α -SMA durchgeführt. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen WT und *Has3* KO Mäusen detektiert werden (siehe Abbildung 18 A, B). Neben α -SMA wurden auch wieder die sensitiveren Marker POSTN und CTHRC1 gefärbt. Allerdings wurden auch hier keine Veränderungen in der Fibroblastenaktivierung der *Has3*-defizienten Tiere festgestellt (siehe Abbildung 18 C-F).

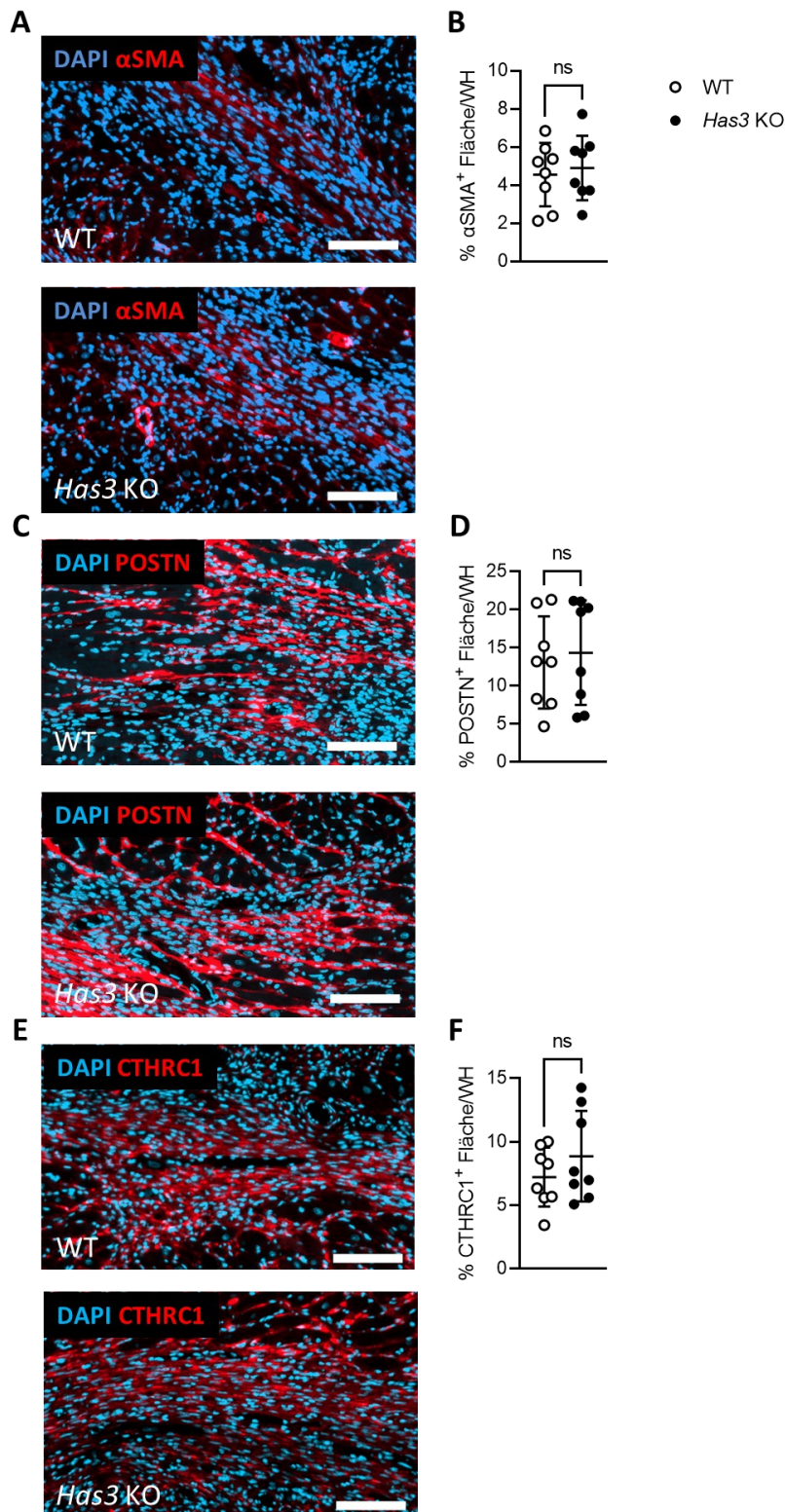


Abbildung 18: Immunhistochemische Bestimmung der Myofibroblasten in Herzgewebe 7 d nach Infarkt.

Die Myofibroblasten wurden in Herzschnitten mithilfe von Antikörpern gegen α -SMA, POSTN und CTHRC1 immunhistochemisch angefärbt und die positive Fläche in ImageJ quantifiziert. **A.** Repräsentative Bilder der α -SMA-gefärbten Schnitte in *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO)

und den zugehörigen Wildtyp-Tieren (WT). **B.** Quantifizierung der α -SMA-positiven Fläche im gesamten Herzen (WH). **C.** Repräsentative Bilder der POSTN-gefärbten Schnitte in *Has3* KO Tieren und den zugehörigen WT Tieren. **D.** Quantifizierung der POSTN-positiven Fläche im gesamten Herzen. **E.** Repräsentative Bilder der CTHRC1-gefärbten Schnitte. **F.** Quantifizierung der CTHRC1-positiven Fläche im gesamten Herzen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=8, 8; *p<0,05.

Neben der immunhistochemischen Analyse der Fibroblasten erfolgte auch die durchflusszytometrische Analyse bezüglich Apoptose und Proliferation. Hier waren weder bei der Anzahl noch beim Anteil der apoptotischen und proliferativen Zellen Unterschiede festzustellen (siehe Abbildung 19).

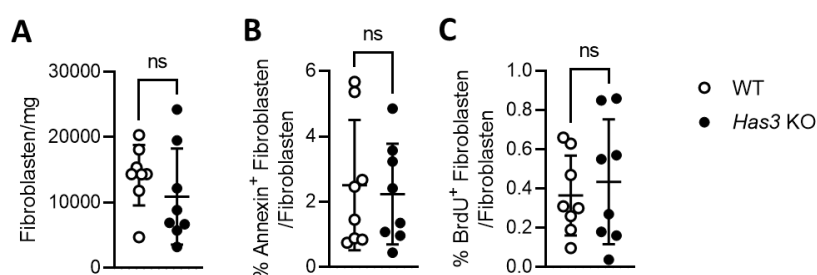


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der Fibroblasten sowie ihrer Apoptose und Proliferation 7 d nach Infarkt.

Die kardialen Fibroblasten wurden durchflusszytometrisch untersucht, um die Apoptose und Proliferation zu beurteilen. **A.** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der Fibroblasten in Herzen von Kontroll- und *Has3*-defizienten Mäusen. **B.** Anzahl kardialer Fibroblasten (ITGA7⁺, Feeder⁺) pro mg Herzgewebe. **C.** Relativer Anteil apoptotischer Zellen (Annexin⁺) an den Gesamtfibroblasten. **D.** Relativer Anteil proliferativer Zellen (BrdU⁺) an den Gesamtfibroblasten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=8, 8.

3.6 Einfluss der HAS3 auf die Immunantwort nach Myokardinfarkt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Defizienz von *Has3* einen Einfluss auf den Infarktphänotyp hat, sollte im Folgenden untersucht werden, wodurch die Unterschiede zu Stande kommen. Da aus früheren Arbeiten unserer Gruppe bereits bekannt war, dass HA einen Einfluss auf die Immunzellantwort nach Myokardinfarkt hat¹³⁴ und auch, dass HAS3 die Immunzellantwort in der Atherosklerose beeinflusst⁹², wurde die Immunantwort infolge der Ischämie näher untersucht. Hierbei wurden neben dem Blut und dem Herzen auch Milz und Lymphknoten als sekundär lymphatische Organe untersucht.

3.6.1 Untersuchung zirkulierender Immunzellen naiver Tiere und 72 h nach Infarkt

Da es sich beim *Knockout* von *Has3*, wie in 2.1.1 beschrieben, um einen konstitutiven *Knockout* handelt, sind basale Unterschiede zu WT-Tieren, die sich bereits während der Embryonalentwicklung ergeben, prinzipiell nicht vollständig auszuschließen. Um solche Effekte zu untersuchen, wurden zunächst die zirkulierenden Immunzellpopulationen im Blut naiver Mäuse durchflusszytometrisch charakterisiert. Dazu wurde Blut aus der Schwanzspitze verwendet. Hierbei wurden neben den Gesamtleukozyten (siehe Abbildung 20 A) einerseits die myeloiden Zellen näher untersucht. Dabei wurde zwischen neutrophilen Granulozyten und Monozyten unterschieden (siehe Abbildung 20 B, C). Letztere wurden wiederum in proinflammatorische Ly6C^{high} und antiinflammatorische Ly6C^{low} Monozyten unterschieden.⁴⁵ Andererseits wurden auch die Subgruppen der lymphoiden Zellen (B- und T-Lymphozyten) untersucht (siehe Abbildung 20 F, G). Bei den T-Zellen wurden weiterhin CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unterschieden (siehe Abbildung 20 H, I). Das entsprechende *Gatingschema* ist in Appendix 1 zu finden. Keine der Populationen zeigte Unterschiede zwischen WT-Tieren und *Has3*-defizienten Tieren.

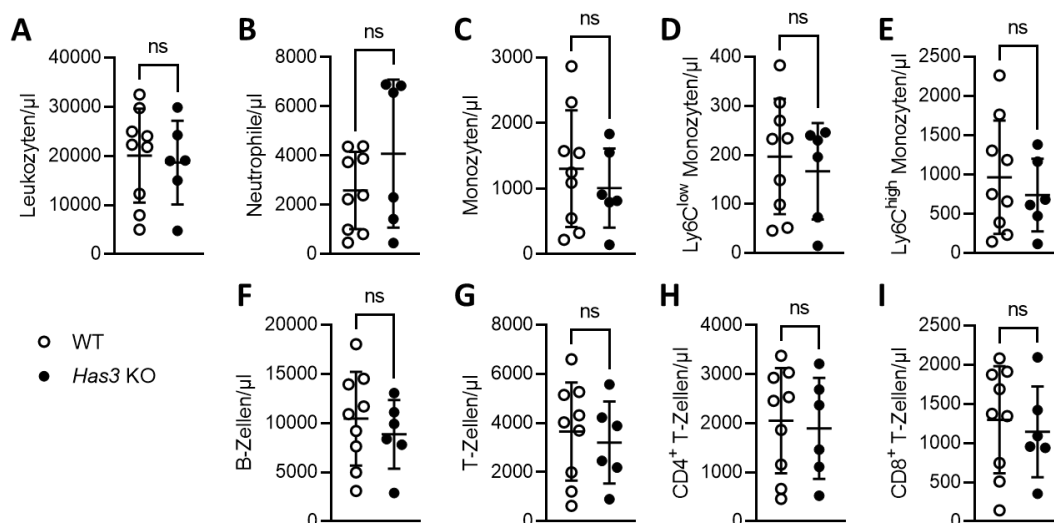


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse der im Blut zirkulierenden Immunzellen naiver Tiere.

Die zirkulierenden Immunzellen naiver Wildtypmäuse (WT) und *Has3*-defizienter Mäuse (*Has3* KO) wurden durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind absolute Zellzahlen pro µL Vollblut für **A.** Gesamtleukozyten (CD45⁺), **B.** Neutrophile Granulozyten (CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁺) **C.** Gesamtmonozyten (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺), **D.** Ly6C^{low} Monozyten (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺, Ly6C^{low}), **E.** Ly6C^{high} Monozyten (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺, Ly6C^{high}), **F.** B-Lymphozyten (CD45⁺, CD19⁺), **G.** T-Lymphozyten (CD45⁺, CD3⁺), **H.** T-Helferzellen (CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺) und **I.** zytotoxische T-Zellen (CD45⁺, CD3⁺, CD8a⁺). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD; n=9, 6.

Nachdem basale Unterschiede hinsichtlich der Blut-Leukozyten zwischen den Genotypen ausgeschlossen werden konnten, wurden die Populationen im kardialen Blut von Tieren 72 h nach Infarkt untersucht. Dabei sollte geklärt werden, ob HAS3 eine Rolle für die frühe Immunantwort nach Herzinfarkt spielt. Auch hier konnten in den zirkulierenden Immunzellen keine Unterschiede festgestellt werden (siehe Abbildung 21). Eine genauere Auswertung der T-Zell-Subpopulationen findet sich in 3.6.4.

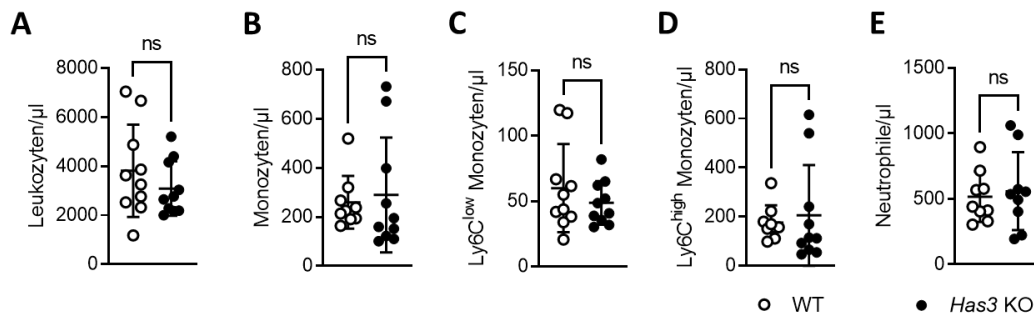


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse der im Blut zirkulierenden Immunzellen 72 h nach Infarkt.

Die zirkulierenden Immunzellen von Wildtypmäusen (WT) und *Has3*-defizienten Mäusen (*Has3* KO) wurden 72 h nach Infarkt durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind absolute Zellzahlen pro μL Vollblut für **A.** Gesamtleukozyten ($\text{CD}45^+$), **B.** Gesamtmonozyten ($\text{CD}45^+$, $\text{CD}11b^+$, $\text{CD}115^+$), **C.** $\text{Ly}6\text{C}^{\text{low}}$ Monozyten ($\text{CD}45^+$, $\text{CD}11b^+$, $\text{CD}115^+$, $\text{Ly}6\text{C}^{\text{low}}$), **D.** $\text{Ly}6\text{C}^{\text{high}}$ Monozyten ($\text{CD}45^+$, $\text{CD}11b^+$, $\text{CD}115^+$, $\text{Ly}6\text{C}^{\text{high}}$) und **E.** Neutrophile Granulozyten ($\text{CD}45^+$, $\text{CD}11b^+$, $\text{Ly}6\text{G}^+$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; $n=10$, 10.

3.6.2 Untersuchung der Immunzellen in der Milz 72 h nach Infarkt

Nachdem im Blut keinerlei Unterschiede bezüglich der Immunzellen festgestellt werden konnten, sollte mit der Milz ein wichtiges lymphatisches Organ auf Veränderungen und damit auf mögliche Ursachen für den schlechteren Infarktphänotyp der *Has3*-defizienten Tiere untersucht werden. Da bekannt ist, dass die Milz nach Infarkt rund 40 % der Monozyten im infarzierten Herz beiträgt¹⁴⁶, ist davon auszugehen, dass Veränderungen der Immunzellen in der Milz auch Effekte auf die Inflammation des Herzens nach Myokardinfarkt haben. Auch die durchflusszytometrische Analyse der Milz zeigte keine signifikanten Effekte der *Has3*-Defizienz auf die Immunzellen (siehe Abbildung 22). Eine genauere Auswertung der T-Zell-Subpopulationen findet sich auch hier in 3.6.4.

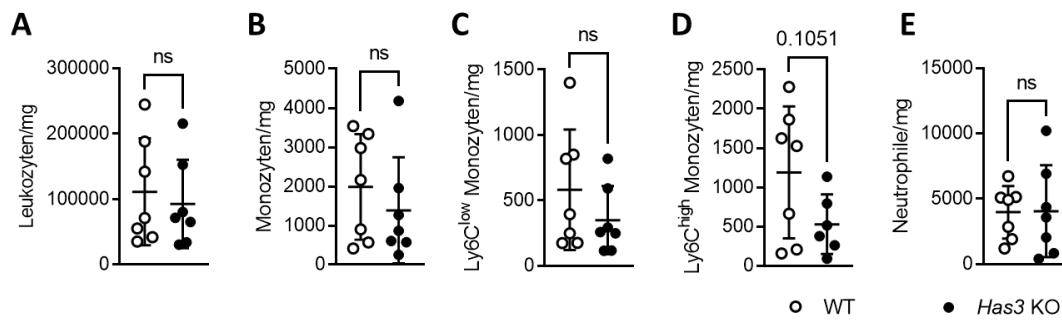


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Immunzellanalyse der Milz 72 h nach Infarkt.

Die Milz von Wildtypmäusen (WT) und *Has3*-defizienten Mäusen (*Has3* KO) wurden 72 h nach Infarkt durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind auf mg Milz normalisierte Zellzahlen für **A.** Gesamtleukozyten (CD45⁺), **B.** Gesamtmonozyten (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺), **C.** Ly6C^{low} Monozyten (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺, Ly6C^{low}), **D.** Ly6C^{high} Monozyten (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺, Ly6C^{high}) und **E.** Neutrophile Granulozyten (CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁺). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=7, 7.

3.6.3 Untersuchung von Monozyten und Makrophagen im Herzgewebe 72 h nach Infarkt

Neben den peripheren Organen wurde auch das Herz selbst, als von der Ischämie betroffenes Organ, untersucht. Dazu wurden zunächst histologische Färbungen für die beiden Makrophagen-Antigene MAC-2 und CD68 angefertigt. Hierzu wurden Schnitte aus der Mitte infarzierter Herzen 72 h nach Infarkt verwendet. Anschließend wurde die positive Fläche bezogen auf den gesamten Schnitt ausgewertet. Für die beiden globalen Makrophagenmarker konnten keine Unterschiede zwischen den WT-Hezen und den *Has3*-defizienten Herzen detektiert werden (siehe Abbildung 23 B, D).

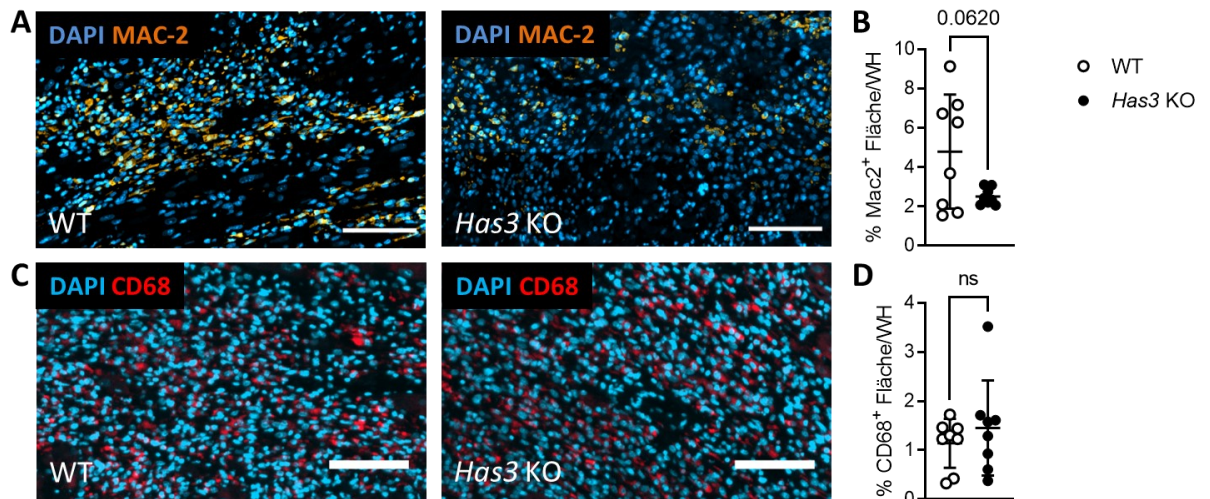


Abbildung 23: Immunhistochemische Bestimmung von Makrophagen in Herzgewebe 72 h nach Infarkt.

Die Makrophagen in Herzschnitten wurden mithilfe von Antikörpern gegen MAC-2 und CD68 immunhistochemisch angefärbt und die positive Fläche in ImageJ quantifiziert. **A.** Repräsentative Bilder der MAC-2-gefärbten Schnitte in *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) und den zugehörigen Wildtypen (WT). **B.** Quantifizierung der MAC-2-positiven Fläche im gesamten Herzen (WH). **C.** Repräsentative Bilder der CD68-gefärbten Schnitte in *Has3* KO Tieren und den zugehörigen WT Tieren. **D.** Quantifizierung der CD68-positiven Fläche im gesamten Herzen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=8, 8.

Da aus Studien zur Rolle der HAS2 im Myokardinfarkt bereits bekannt war, dass die Subgruppen nicht in derselben Weise beeinflusst werden¹³⁴, und sich damit Subgruppenunterschiede nicht zwingend in der Gesamtmakrophagenzahl niederschlagen müssen, wurde für das Herzgewebe eine detailliertere durchflusszytometrische Untersuchung der Monozyten und Makrophagen durchgeführt. Die Subtypen wurden dabei gemäß der Literatur anhand der Oberflächenmarker MHCII, CD64 und CCR2 definiert.^{52, 134} Zunächst wurde eine grundlegende Unterscheidung in Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und innerhalb dieser in pro- bzw. antiinflammatorische Makrophagen vorgenommen (siehe Abbildung 24 A-E). Anschließend folgte eine weitere Unterscheidung der Makrophagen in vier Subgruppen. Diese umfassten Monozyten (CD64^{int}, CCR2⁺, MHCII^{low}), aus Monozyten ausdifferenzierte Makrophagen (CD64^{high}, CCR2⁺, MHCII^{high}) sowie eine Gruppe MHCII^{low} residenter Makrophagen (CD64^{high}, CCR2⁻, MHCII^{low}) und eine Gruppe MHCII^{high} residenter Makrophagen (CD64^{high}, CCR2⁻, MHCII^{high}) (siehe Abb. 20 F-I). Das *Gatingschema* ist Appendix 2 zu entnehmen. Keine der analysierten Populationen zeigte signifikante Unterschiede zwischen den WT und den *Has3*-defizienten Tieren (siehe Abbildung 24).

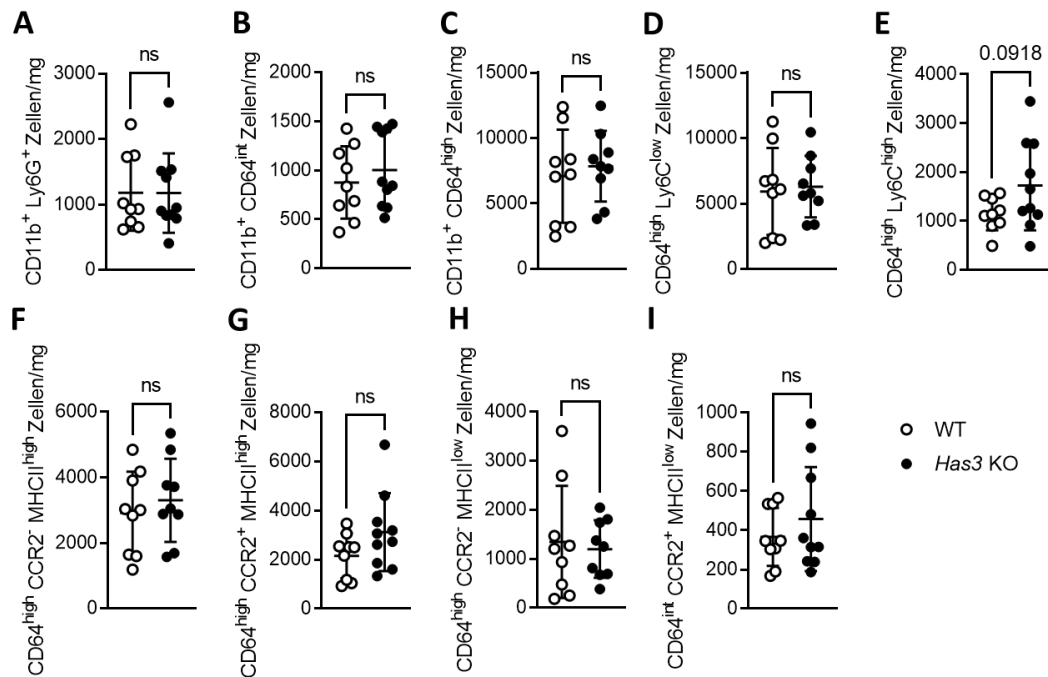


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Analyse kardialer Monozyten/Makrophagen 72 h nach Infarkt.

Die Herzen von Wildtypmäusen (WT) und *Has3*-defizienten Mäusen (*Has3* KO) wurden 72 h nach Infarkt durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind aufs Herzgewicht normalisierte Zellzahlen pro mg Gewebe. **A.** Neutrophile Granulozyten (CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁺), **B.** Gesamtmonozyten (CD45⁺, CD11b⁺, CD64^{int}), **C.** Gesamtmakrophagen (CD45⁺, CD11b⁺, CD64^{high}), **D.** Ly6C^{low} Makrophagen (CD45⁺, CD11b⁺, CD64^{high}, Ly6C^{low}), **E.** Ly6C^{high} Makrophagen (CD45⁺, CD11b⁺, CD64^{high}, Ly6C^{high}), **F.** residente MHCII^{high} Makrophagen (CD64^{high}, CCR2⁻, MHCII^{high}), **G.** Monozyten-differenzierte Makrophagen (CD64^{high}, CCR2⁺, MHCII^{high}), **H.** residente MHCII^{low} Makrophagen (CD64^{high}, CCR2⁻, MHCII^{low}) und **I.** Monozyten (CD64^{int}, CCR2⁺, MHCII^{low}). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9, 10.

Die Gruppen aus Abbildung 24 F-I wurden nochmals weiter im Detail untersucht. Hierzu wurde den Tieren 4 h vor der Organentnahme BrdU appliziert und somit die proliferierenden Zellen markiert. Apoptotische Zellen wurden über Annexin V definiert. Anschließend wurde jede Monozyten/Makrophagen Subpopulation nochmal basierend auf ihrer Ly6C-Expression in je eine pro- und antiinflammatorische Gruppe aufgeteilt. Von diesen Gruppen wurde jeweils der Anteil apoptotischer Zellen (Annexin⁺) und proliferativer Zellen (BrdU⁺) bestimmt. Somit waren nicht nur präzise Rückschlüsse auf den Charakter der Populationen möglich, sondern bei Veränderungen der Prävalenz auch eine Aussage darüber, ob die Gründe in einer veränderten Apoptose oder Proliferation liegen. Das *Gatingschema* ist in Appendix 2 gezeigt.

Als Erstes wurde die Gruppe der residenten MHCII^{high} Makrophagen (vgl. Abbildung 24 F) näher betrachtet. Bezüglich der Zellzahl, Apoptose und Proliferation waren keine

Unterschiede erkennbar (siehe Abbildung 25 A-C) und auch innerhalb der antiinflammatorischen Population gab es keine Effekte (siehe Abbildung 25 D-F).

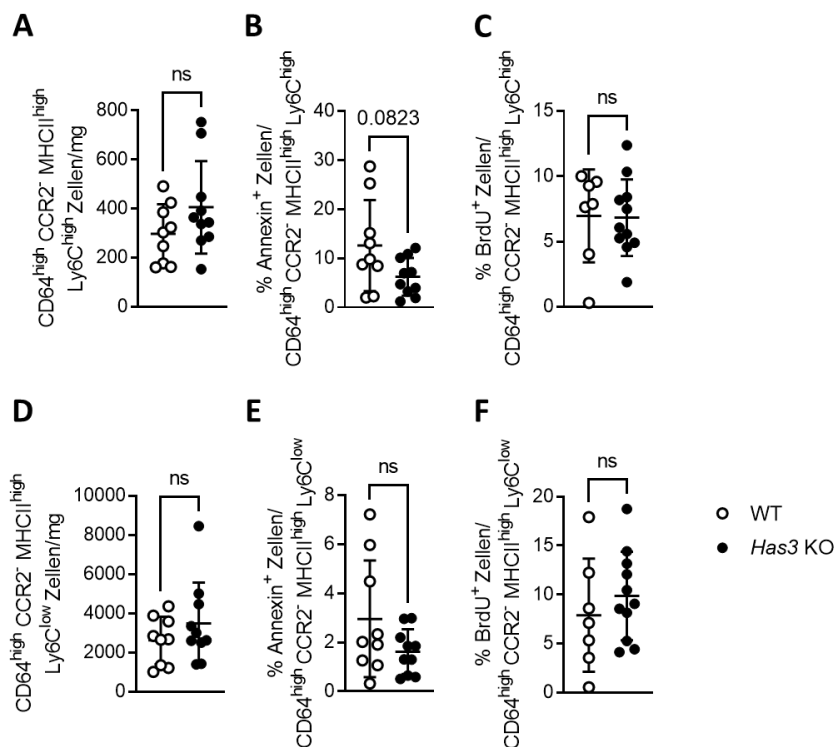


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse des inflammatorischen Status, der Apoptose und der Proliferation kardialer residenter MHCII^{high} Makrophagen 72 h nach Infarkt.

Die kardialen residenten MHCII^{high} Makrophagen wurden durchflusszytometrisch untersucht, um die Apoptose und Proliferation der pro- und antiinflammatorischen Subpopulationen zu beurteilen. **A.** Anzahl proinflammatorischer residenter MHCII^{high} Makrophagen (CD64^{high}, CCR2⁻, MHCII^{high}, Ly6C^{high}) pro mg Herzgewebe. **B.** Relativer Anteil apoptotischer Zellen (Annexin⁺) bezogen auf die Gesamtheit proinflammatorischer residenter MHCII^{high} Makrophagen. **C.** Relativer Anteil proliferativer Zellen (BrdU⁺) bezogen auf die Gesamtheit proinflammatorischer residenter MHCII^{high} Makrophagen. **D.** Anzahl antiinflammatorischer residenter MHCII^{high} Makrophagen (CD64^{high}, CCR2⁻, MHCII^{high}, Ly6C^{low}) pro mg Herzgewebe. **E.** Relativer Anteil apoptotischer Zellen (Annexin⁺) bezogen auf die Gesamtheit antiinflammatorischer residenter MHCII^{high} Makrophagen. **F.** Relativer Anteil proliferativer Zellen (BrdU⁺) bezogen auf die Gesamtheit antiinflammatorischer residenter MHCII^{high} Makrophagen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9, 10.

Anschließend wurde die Gruppe der Monozyten-differenzierten Makrophagen (vgl. Abbildung 24 G) untersucht. Die Analyse zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl proinflammatorischer Makrophagen (CD64^{high}, CCR2⁺, MHCII^{high}, Ly6C^{high}) pro mg Herzgewebe (siehe Abbildung 26 B). Bezüglich der Apoptose und Proliferation waren keine eindeutigen Unterschiede erkennbar (siehe Abbildung 26 C, D) und auch in der antiinflammatorischen Population gab es wiederum keine Effekte (siehe Abbildung 26 E-G).

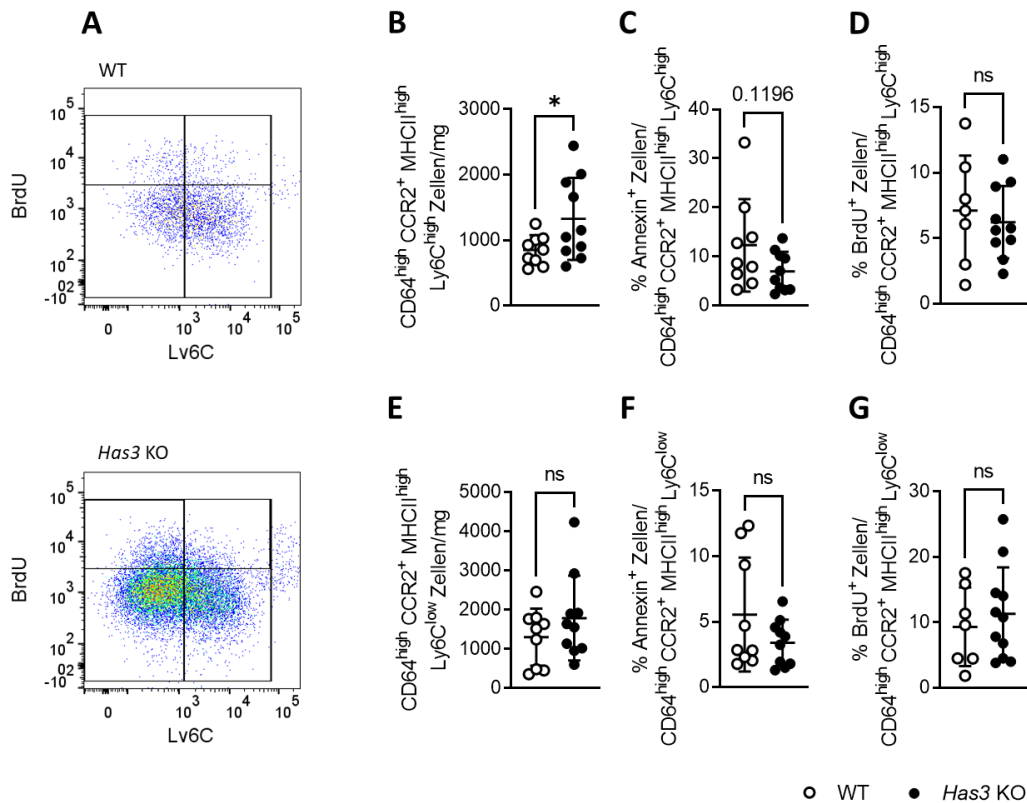


Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse des inflammatorischen Status, der Apoptose und der Proliferation kardialer Monozyten-differenzierter Makrophagen 72 h nach Infarkt.

Die kardialen Monozyten-differenzierten Makrophagen wurden durchflusszytometrisch untersucht, um die Apoptose und Proliferation der pro- und antiinflammatorischen Subpopulationen zu beurteilen. **A.** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der Untersuchung der Proliferation Monozyten-differenzierter Makrophagen in Herzen von Wildtyp (WT) und *Has3*-defizienten (*Has3* KO) Mäusen. **B.** Anzahl proinflammatorischer Monozyten-differenzierter Makrophagen (CD64^{high}, CCR2⁺, MHCII^{high}, Ly6C^{high}) pro mg Herzgewebe. **C.** Relativer Anteil apoptotischer Zellen (Annexin⁺) bezogen auf die Gesamtheit proinflammatorischer Monozyten-differenzierter Makrophagen. **D.** Relativer Anteil proliferativer Zellen (BrdU⁺) bezogen auf die Gesamtheit proinflammatorischer Monozyten-differenzierter Makrophagen. **E.** Anzahl antiinflammatorischer Monozyten-differenzierter Makrophagen (CD64^{high}, CCR2⁺, MHCII^{high}, Ly6C^{low}) pro mg Herzgewebe. **F.** Relativer Anteil apoptotischer Zellen (Annexin⁺) bezogen auf die Gesamtheit antiinflammatorischer Monozyten-differenzierter Makrophagen. **G.** Relativer Anteil proliferativer Zellen (BrdU⁺) bezogen auf die Gesamtheit antiinflammatorischer Monozyten-differenzierter Makrophagen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD; n=9, 10; *p<0,05.

Als dritte Gruppe wurden die residenten MHCII^{low} Makrophagen (vgl. Abbildung 24 H) näher betrachtet. Hier waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen erkennbar - weder in Anzahl noch in Apoptose oder Proliferation der Zellen (siehe Abbildung 27).

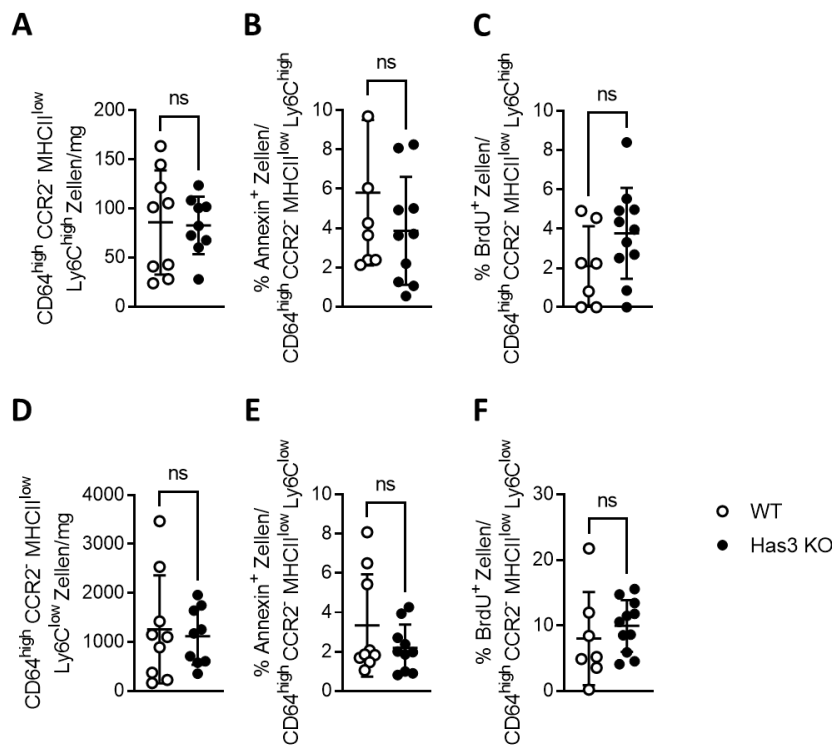


Abbildung 27: Durchflusszytometrische Analyse des inflammatorischen Status, der Apoptose und der Proliferation kardialer residenter MHCII^{low} Makrophagen 72 h nach Infarkt.

Die kardialen residenten MHCII^{low} Makrophagen wurden durchflusszytometrisch untersucht, um die Apoptose und Proliferation der pro- und antiinflammatorischen Subpopulationen zu beurteilen. **A.** Anzahl proinflammatorischer residenter MHCII^{low} Makrophagen (CD64^{high}, CCR2⁻, MHCII^{low}, Ly6C^{high}) pro mg Herzgewebe. **B.** Relativer Anteil apoptotischer Zellen (Annexin⁺) bezogen auf die Gesamtheit proinflammatorischer residenter MHCII^{low} Makrophagen. **C.** Relativer Anteil proliferativer Zellen (BrdU⁺) bezogen auf die Gesamtheit proinflammatorischer residenter MHCII^{low} Makrophagen. **D.** Anzahl antiinflammatorischer residenter MHCII^{low} Makrophagen (CD64^{high}, CCR2⁻, MHCII^{low}, Ly6C^{low}) pro mg Herzgewebe. **E.** Relativer Anteil apoptotischer Zellen (Annexin⁺) bezogen auf die Gesamtheit antiinflammatorischer residenter MHCII^{low} Makrophagen. **F.** Relativer Anteil proliferativer Zellen (BrdU⁺) bezogen auf die Gesamtheit antiinflammatorischer residenter MHCII^{low} Makrophagen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9, 10.

Abschließend wurden die Monozyten eingehender untersucht. Da Monozyten im Gewebe nicht proliferieren, sind hier keine BrdU⁺ Zellen aufgeführt. Wie bei den residenten MHCII^{low} Makrophagen zeigten sich auch hier keine Unterschiede zwischen den betrachteten Genotypen (siehe Abbildung 28).

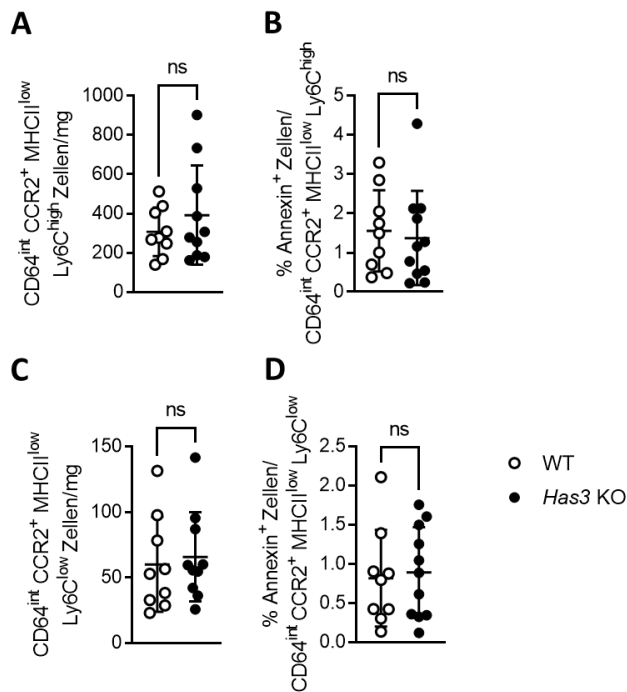


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse des inflammatorischen Status und der Apoptose kardialer Monozyten 72 h nach Infarkt.

Die kardialen Monozyten wurden durchflusszytometrisch untersucht, um die Apoptose der pro- und antiinflammatorischen Subpopulationen zu beurteilen. **A.** Anzahl proinflammatorischer Monozyten (CD64^{int}, CCR2⁺, MHCII^{low}, Ly6C^{high}) pro mg Herzgewebe. **B.** Relativer Anteil apoptotischer Zellen (Annexin⁺) bezogen auf die Gesamtheit proinflammatorischer Monozyten. **C.** Anzahl antiinflammatorischer Monozyten (CD64^{int}, CCR2⁺, MHCII^{low}, Ly6C^{low}) pro mg Herzgewebe. **D.** Relativer Anteil apoptotischer Zellen (Annexin⁺) bezogen auf die Gesamtheit antiinflammatorischer Monozyten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9, 10.

3.6.4 Untersuchung der T-Zell-Subtypen 72 h nach Infarkt

Neben den myeloiden Zellen spielen auch lymphoide Zellen eine Rolle in der Entzündungsreaktion nach Herzinfarkt. Da in früheren Arbeiten bereits ein Einfluss der HAS3 auf die Funktion einiger T-Zell-Subtypen im Kontext der Atherosklerose gezeigt werden konnte,⁹² wurde eine detaillierte durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Subtypen durchgeführt. Hierbei sollte untersucht werden, ob, vergleichbar zur chronischen Entzündung in der Atherosklerose, auch im akut inflammatorischen Geschehen des Myokardinfarktes eine Beeinflussung der T-Zell-Antwort durch HAS3

stattfindet. Dazu wurde zunächst der Zeitpunkt drei Tage nach Infarkt betrachtet, da hier der Höhepunkt der Inflammationsreaktion liegt.⁵⁸ Neben dem Herz wurden auch die im Blut zirkulierenden Zellen sowie die Milz und die mediastinalen Lymphknoten untersucht. Für die Analyse wurde bei den CD3⁺ Zellen zwischen CD4⁺-, CD8⁺- und CD4⁺CD8⁻ T-Zellen unterschieden. Die CD4⁺CD8⁻-Zellen werden hier als $\gamma\delta$ T-Zellen bezeichnet, eine Gruppe unkonventioneller T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor, anders als der $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor, hauptsächlich Nicht-Peptid-Antigene, z.B. Lipide, erkennt.¹⁴⁷ Tatsächlich handelt es sich bei der Subgruppe der CD4⁺CD8⁻ Zellen um eine heterogene Gruppe, die nicht ausschließlich $\gamma\delta$ T-Zellen enthält, aber stark für diese angereichert ist.

3.6.4.1 Blut

Zur Etablierung der durchflusszytometrischen Methodik wurde zunächst mit Blut gearbeitet. Dabei wurde auf die gut etablierten Oberflächenmarker zurückgegriffen. Neben den grundlegenden Markern zur Definition von T-Zellen (CD3⁺) und ihrer Unterteilung in T-Helferzellen (CD4⁺) und zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) wurden zur weiteren Charakterisierung die Marker CXCR3 (Th1), CCR4 (Th2), CCR6 (Th17) und CD25 (Treg) hinzugefügt. Außerdem wurde auch eine Analyse der Aktivierung durchgeführt. Hierbei wurde für die frühe Aktivierung der Marker CD69 verwendet. Über CD44 und CD62L ließen sich naive (CD44^{low}, CD62L^{high}), Gedächtnis- (CD44^{high}, CD62L^{high}) und Effektor-T-Zellen (CD44^{high}, CD62L^{low}) unterscheiden. Das *Gating*-schema ist in Appendix 3 dargestellt. Im Blut zeigte sich in keiner der untersuchten Subgruppen ein Unterschied (siehe Abbildung 29).

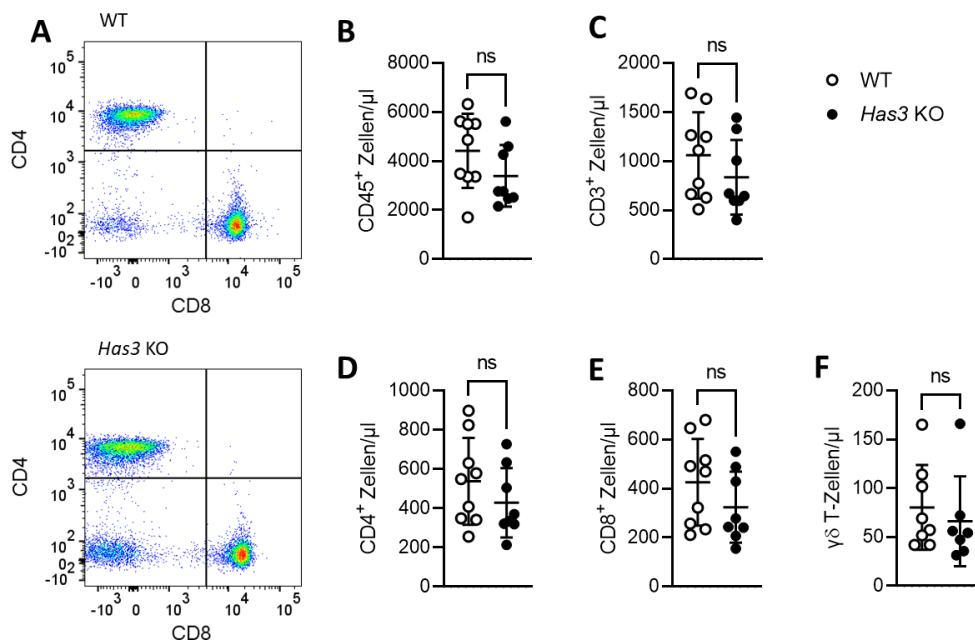


Abbildung 29: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten im Blut 72 h nach Infarkt.

Die T-Zellen im kardialen Blut von Wildtyp-Tieren (WT) und *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) wurden 72 h nach Infarkt durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen pro μL Vollblut. **A.** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der CD3^+ Zellen im Blut. **B.** Leukozyten, **C.** T-Lymphozyten, **D.** T-Helferzellen, **E.** zytotoxische T-Zellen und **F.** $\gamma\delta$ T-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; $n=9, 8$.

Während sich keine Unterschiede in den absoluten Zellzahlen ergaben, zeigte sich in der relativen Auswertung eine Verschiebung in Richtung von mehr CD4^+ -Effektorzellen. Konkret war der Anteil der naiven T-Zellen in den *Has3*-defizienten Tieren um rund 5 % erniedrigt (siehe Abbildung 30 B), während der Anteil der Effektorzellen um rund 5 % höher lag (siehe Abbildung 30 D). Begleitet wurde dies von einem starken Trend ($p = 0,12$) zu einem erhöhten Anteil von $\text{CD69}^+ \text{CD4}^+$ Zellen (siehe Abbildung 30 A). Die Gedächtniszellen waren hingegen unbeeinflusst (siehe Abbildung 30 C).

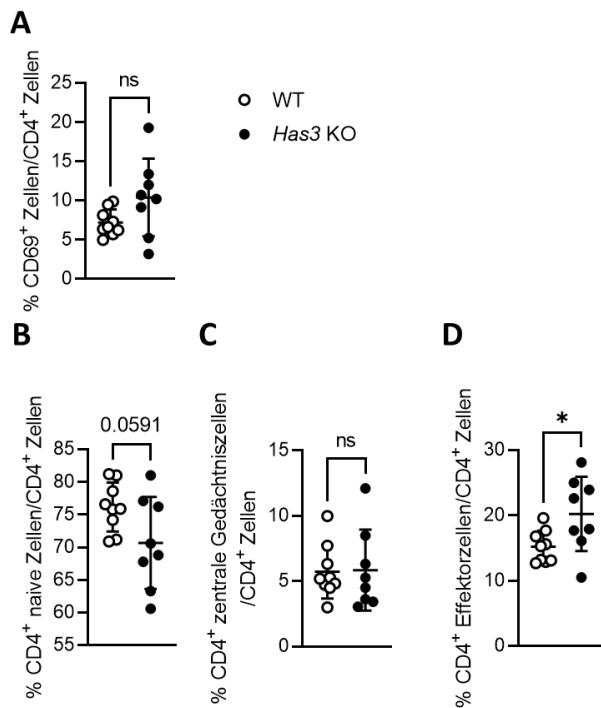


Abbildung 30: Durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsstatus der zirkulierenden T-Helferzellen 72 h nach Infarkt.

Die T-Helferzellen im Blut von Wildtypmäusen (WT) und *Has3*-defizienten Mäusen (*Has3* KO) wurden bezüglich ihres Aktivierungsstatus untersucht. Dargestellt sind die relativen Anteile an der Gesamtheit der CD4⁺ Zellen. **A.** Frühe aktivierte T-Zellen, **B.** Naive T-Zellen (CD44^{low}, CD62L^{high}), **C.** Zentrale Gedächtniszellen (CD44^{high}, CD62L^{high}) und **D.** Effektorzellen (CD44^{high}, CD62L^{low}). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=9, 8; *p<0,05.

3.6.4.2 Milz

Die Milz stellt als größtes sekundär lymphatisches Organ ein wichtiges Reservoir für T-Zellen dar und spielt zugleich eine wichtige Rolle in ihrer Aktivierung.¹⁴⁸ Es ist bekannt, dass infolge eines Herzinfarktes APC Antigene aus dem infarzierten Herz in der Milz präsentieren und damit zur inflammatorischen Reaktion beitragen.¹⁴⁹ Daher wurden auch hier die T-Zell-Populationen untersucht. Tatsächlich zeigten sich für alle Subtypen deutlich reduzierte Zellzahlen pro mg Milzgewebe (siehe Abbildung 31). Allerdings ist dazu zu erwähnen, dass ebenfalls ein signifikant erhöhtes Milzgewicht in den *Has3*-defizienten Tieren vorlag (siehe Abbildung 31 G). Somit ist wahrscheinlich, dass sich diese Effekte lediglich rechnerisch durch die Normalisierung auf das Milzgewicht ergaben und tatsächlich keine unterschiedlichen Zellzahlen vorlagen. Das erhöhte Milzgewicht könnte seine Ursache in einem Ödem aufgrund des Blutrückstaus aus dem insuffizienten Herz haben.¹⁵⁰

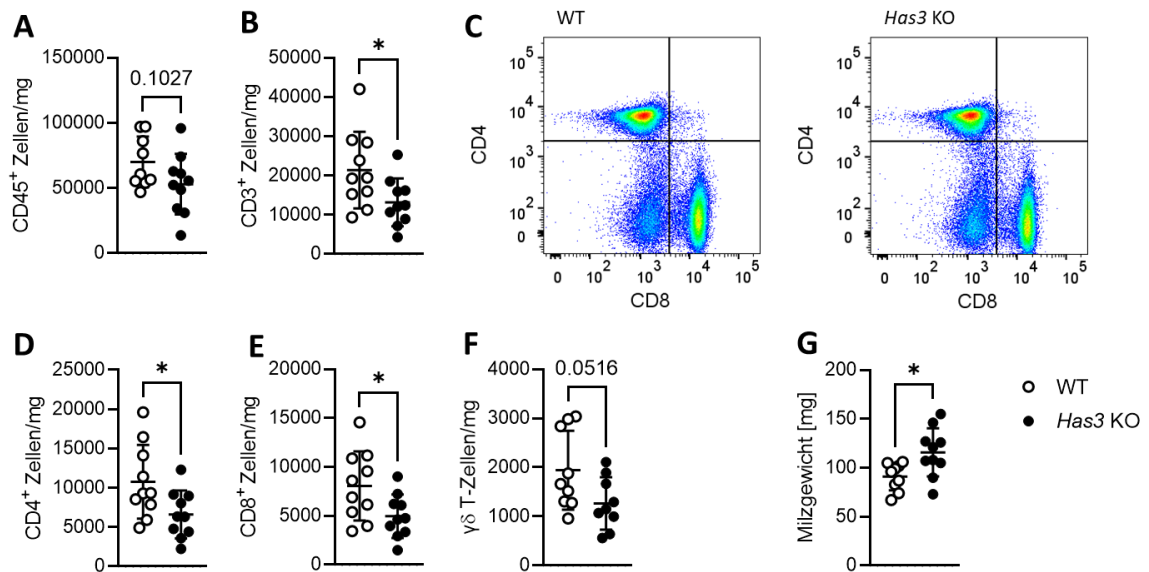


Abbildung 31: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten in der Milz 72 h nach Infarkt.

Die T-Zellen in der Milz von Wildtypieren (WT) und *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) wurden 72 h nach Infarkt durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen pro mg Milzgewebe. **A.** Leukozyten, **B.** T-Lymphozyten, **C.** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der CD3⁺ Zellen in der Milz. **D.** T-Helferzellen, **E.** zytotoxische T-Zellen und **F.** $\gamma\delta$ T-Zellen. **G.** Milzmasse. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=10, 10; *p<0,05.

3.6.4.3 Lymphknoten

Neben der Milz zählen auch Lymphknoten zu den sekundär lymphatischen Organen. Dabei drainieren Lymphknoten jeweils ein spezifisches Einzugsgebiet in ihrer Nähe. Für die Drainage des Herzens sind die mediastinalen Lymphknoten zuständig.¹³⁹ Zur Analyse wurden die intrathorakal rechts und links des Thymus liegenden Lymphknoten entnommen. Aufgrund des sehr geringen Gewichtes wurde bei der Auswertung auf eine Normalisierung verzichtet und die Populationen relativ ausgewertet. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den Wildtypieren und den *Has3* KO Tieren festgestellt werden (siehe Abbildung 32).

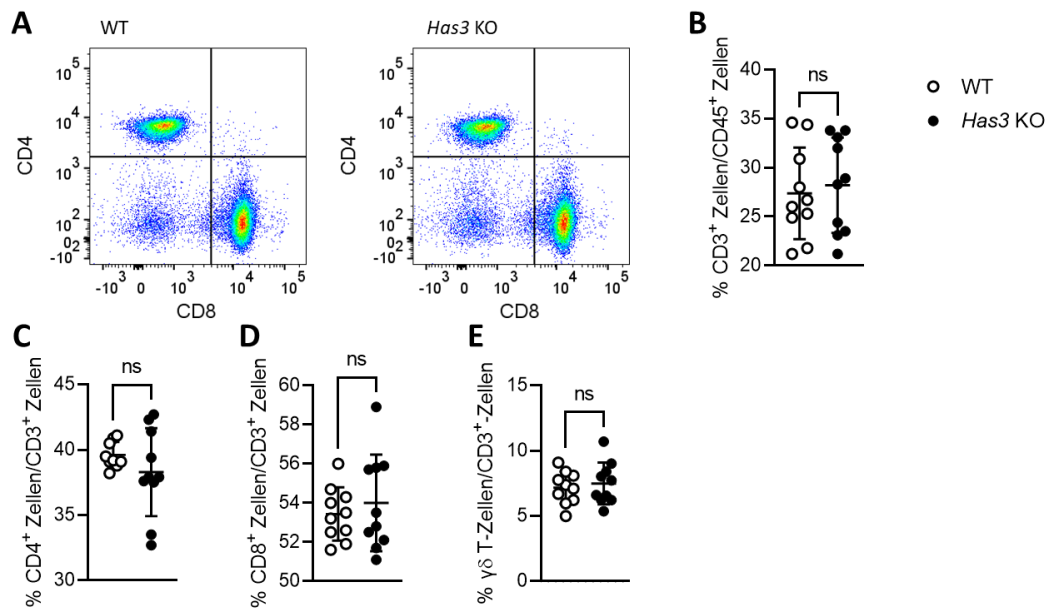


Abbildung 32: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten 72 h nach Infarkt.

Die mediastinalen Lymphknoten von Wildtyp-Tieren (WT) und *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) wurden 72 h nach Infarkt durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die relativen Anteile an (B) den Gesamtleukozyten bzw. (C-E) den Gesamt-T-Zellen. **A.** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der CD3⁺ Zellen in den Lymphknoten. **B.** T-Zellen, **C.** T-Helferzellen, **D.** zytotoxische T-Zellen und **E.** $\gamma\delta$ T-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=10, 10.

3.6.4.4 Herz

Parallel zu den vorhergehend gezeigten Organen wurden auch die T-Lymphozyten im Herz untersucht. Nachdem seit vielen Jahren die Rolle der Immunantwort des angeborenen Immunsystems im Herzinfarkt intensiv untersucht wird, ist die Rolle des adaptiven Immunsystems noch in weiten Teilen unbekannt.¹⁵¹ Es gibt jedoch eine wachsende Zahl an Publikationen, die auch die Relevanz dieses Teils des Immunsystems im Herzen herausstellen.¹⁵¹⁻¹⁵³ Dabei spielen insbesondere die verschiedenen Subtypen der T-Zellen ganz unterschiedliche Rollen.¹⁵³ Daher wurde auch hier eine genaue Betrachtung der wesentlichen Subtypen vorgenommen. Die Analyse zeigte, dass es zum untersuchten Zeitpunkt 72 h nach Infarkt keine signifikanten Effekte des *Has3* KO auf die T-Zell-Antwort gab (siehe Abbildung 33). Auch die Zellzahlen und relativen Verteilungen der Subtypen zeigten keine Veränderung (Daten nicht gezeigt).

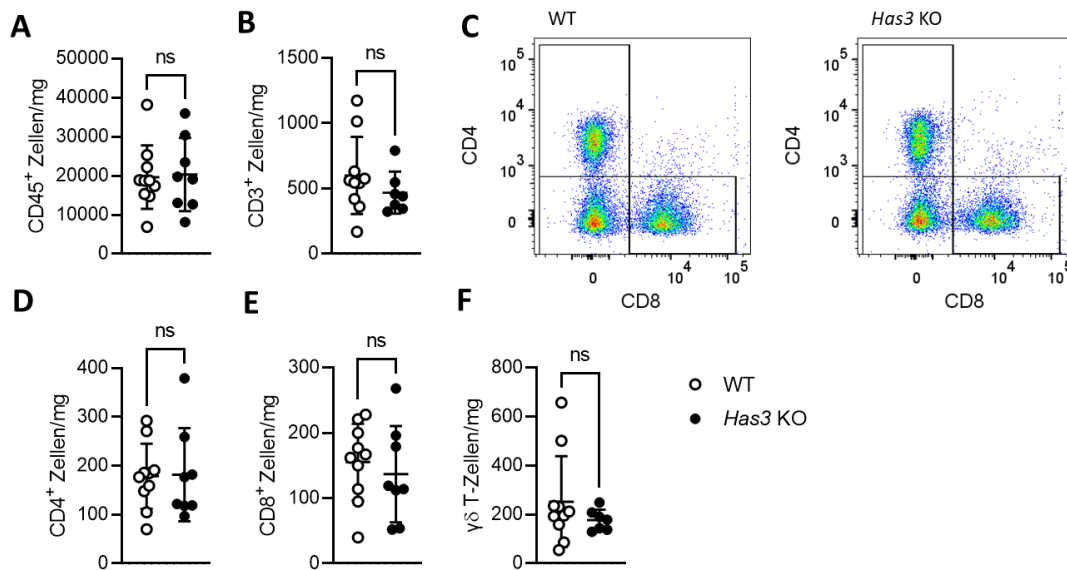


Abbildung 33: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten im Herz 72 h nach Infarkt.

Die T-Zellen im Herz von Wildtyp-Tieren (WT) und *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) wurden 72 h nach Infarkt durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen pro mg Herzgewebe. **A.** Leukozyten, **B.** T-Lymphozyten, **C.** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der CD3⁺ Zellen im Blut. **D.** T-Helferzellen, **E.** zytotoxische T-Zellen und **F.** $\gamma\delta$ T-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=10, 8.

3.6.5 Untersuchung der T-Zell-Subtypen 7 d nach Infarkt

Nachdem der frühe Zeitpunkt 72 h nach Infarkt keine Effekte im Herz erkennen ließ, wurde ein weiterer, späterer Zeitpunkt untersucht. Aus anderen Infarktmodellen ist bekannt, dass der Höhepunkt der T-Zell-Antwort an Tag 7 nach Infarkt liegt.⁵⁸ Daher wurde auch dieser spätere Zeitpunkt untersucht.

3.6.5.1 Herz

Es wurden die gleichen Analysen durchgeführt, wie auch zum Zeitpunkt 72 h nach Infarkt. Dabei deutete sich eine reduzierte T-Zell-Zahl im Herz an (siehe Abbildung 34 B). Die genauere Betrachtung der Subgruppen zeigte eine signifikant verringerte Anzahl von T-Helferzellen und $\gamma\delta$ T-Zellen (siehe Abbildung 34 D-F).

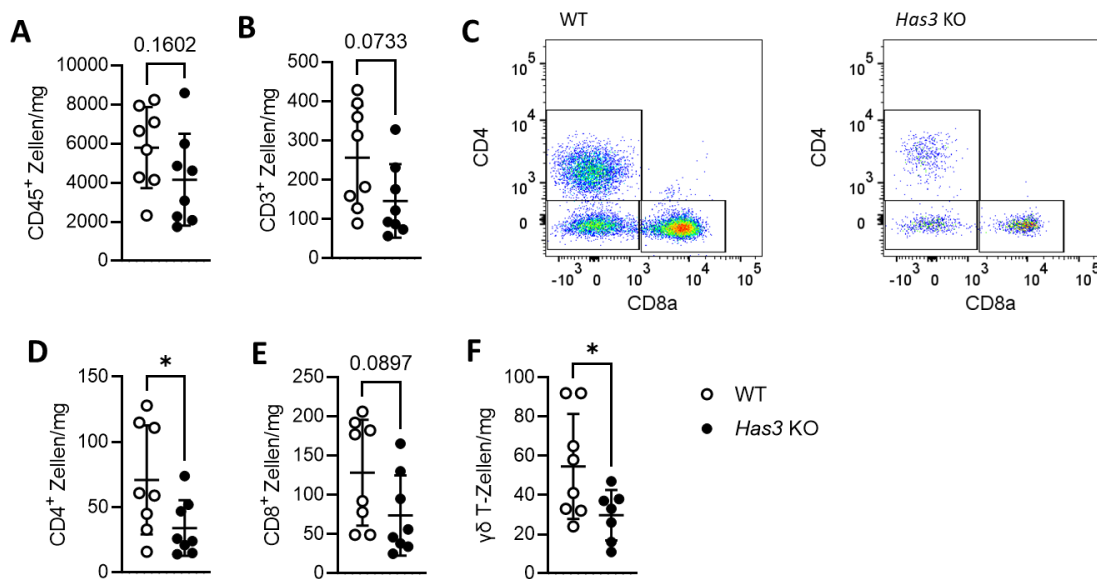


Abbildung 34: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten im Herz 7 d nach Infarkt.

Die T-Zellen im Herz von Wildtyp-Tieren (WT) und *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) wurden 7 d nach Infarkt durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen pro mg Herzgewebe. **A.** Leukozyten, **B.** T-Lymphozyten, **C.** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der CD3⁺ Zellen im Blut. **D.** T-Helferzellen, **E.** zytotoxische T-Zellen und **F.** $\gamma\delta$ T-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=8, 8; *p<0,05.

Nachdem eine verringerte T-Helferzell-Zahl in den *Has3* KO Mäusen festgestellt worden war, sollte untersucht werden, ob diese Reduktion auf eine bestimmte CD4⁺-Population zurückzuführen ist. Hierzu wurde auf Basis der oben genannten Marker eine durchflusszytometrische Quantifizierung durchgeführt. Dabei wurde zwischen Th1 (CXCR3⁺), Th2 (CCR4⁺), Th17 (CCR6⁺) und Treg (CD25⁺) unterschieden. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Th1-Zellen und der Treg (siehe Abbildung 35 A, G). Th2 und Th17-Zellen waren nicht signifikant reduziert (siehe Abbildung 35 C, E).

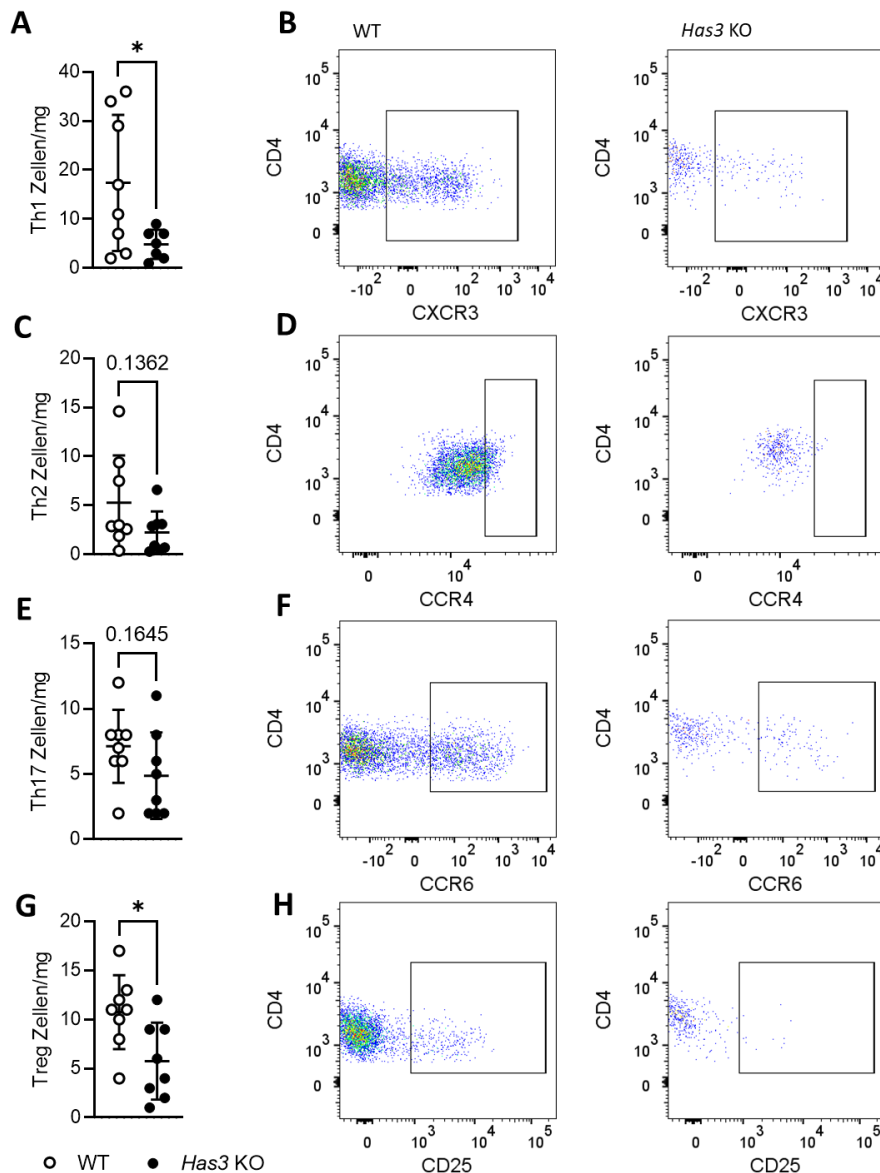


Abbildung 35: Durchflusszytometrische Analyse der T-Helferzell-Subpopulationen im Herz 7 d nach Infarkt.

Die T-Helferzellen im Herz von Wildtyp-Tieren (WT) und *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) wurden 7 d nach Infarkt durchflusszytometrisch gemäß ihren Subtypen charakterisiert. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen pro mg Herzgewebe und die zugehörigen repräsentativen durchflusszytometrischen Plots. **A.** Th1-Zellen (CXCR3⁺) mit **B.** repräsentativen Plots. **C.** Th2-Zellen (CCR4⁺) mit **D.** repräsentativen Plots. **E.** Th17-Zellen (CCR6⁺) mit **F.** repräsentativen Plots. **G.** Treg-Zellen (CD25⁺) mit **H.** repräsentativen Plots. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n=8, 8; *p<0,05.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass hauptsächlich die Th1- und die Treg-Zellen für die verringerte Gesamtzahl an T-Helferzellen verantwortlich waren, sollte darüber hinaus auch die Aktivierung der T-Zellen näher betrachtet werden. Dazu wurde einerseits die frühe Aktivierung anhand von CD69 beurteilt, andererseits auch eine Unterteilung der

Zellen in naive, Gedächtnis- und Effektorzellen vorgenommen. Hier konnte eine signifikant geringere Zahl von CD69⁺ Zellen in den *Has3*-defizienten Tieren beobachtet werden. Einhergehend damit zeigte sich auch eine Tendenz hinsichtlich reduzierter CD4⁺ Effektorzellen. Beide Zelltypen waren auf rund die Hälfte verringert (siehe Abbildung 36 B, E). Dies legte nahe, dass eine verminderte Aktivierung der T-Zellen für die geringeren Zellzahlen verantwortlich sein könnte. Die naiven T-Zellen und Gedächtniszellen zeigten keine Unterschiede (siehe Abbildung 36 C, D).

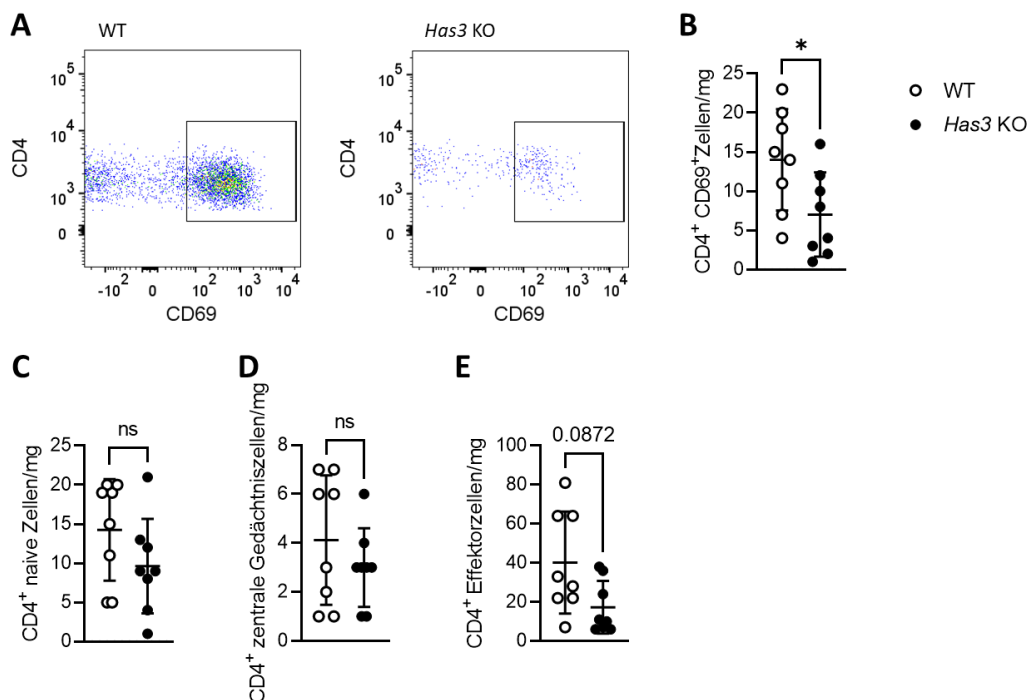


Abbildung 36: Durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsstatus der zirkulierenden T-Helferzellen 7 d nach Infarkt.

Die T-Helferzellen in den Herzen von Wildtypmäusen (WT) und *Has3*-defizienten Mäusen (*Has3* KO) wurden bezüglich ihres Aktivierungsstatus untersucht. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen pro mg Herzgewebe. **A.** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der frühen aktivierten T-Zellen im Herz von *Has3* KO Tieren und WT Tieren. **B.** Frühe aktivierte T-Zellen, **C.** naive T-Zellen (CD44^{low}, CD62L^{high}), **D.** zentrale Gedächtniszellen (CD44^{high}, CD62L^{high}) und **E.** Effektorzellen (CD44^{high}, CD62L^{low}). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n=8, 8; *p<0,05.

3.6.5.2 Milz

Nach Detektion der verringerten T-Zell-Zahl im Herzen sollte als nächstes die zugrunde liegende Ursache gefunden werden. Wie bereits erwähnt, stellt die Milz als größtes sekundär lymphatisches Organ einen wichtigen Ort der T-Zell-Aktivierung dar.¹⁴⁸ Daher wurde untersucht, ob sich mit dem Herz vergleichbare Effekte auch in der Milz

nachweisen lassen. Dabei konnte gezeigt werden, dass keine Unterschiede in den Zellzahlen in der Milz vorliegen (siehe Abbildung 37).

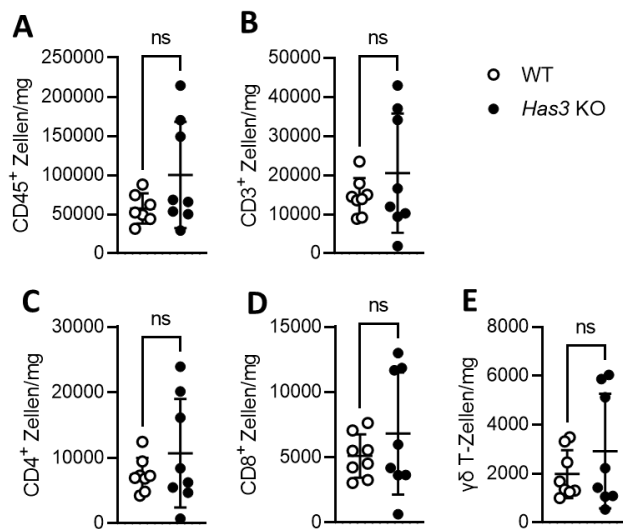


Abbildung 37: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten in der Milz 7 d nach Infarkt.

Die T-Zellen in der Milz von Wildtyp-Tieren (WT) und *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) wurden 7 d nach Infarkt durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen pro mg Milzgewebe. **A.** Leukozyten, **B.** T-Lymphozyten, **C.** T-Helferzellen, **D.** zytotoxische T-Zellen und **E.** $\gamma\delta$ T-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=8, 8.

3.6.5.3 Lymphknoten

Neben der Milz bilden auch die Lymphknoten einen wichtigen Ort der T-Zell-Aktivierung. Die untersuchten mediastinalen Lymphknoten sind das Ziel der APC, die infolge des Herzinfarktes aus dem Herz auswandern. Daher wurden auch die Lymphknoten durchflusszytometrisch bezüglich der T-Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante Erniedrigung des Anteils der T-Zellen an den Gesamtleukozyten (siehe Abbildung 38 B). Innerhalb der T-Zellen konnten keine Verschiebungen in den Anteilen der Subgruppen an den Gesamt-T-Zellen gezeigt werden (siehe Abbildung 38 C-E).

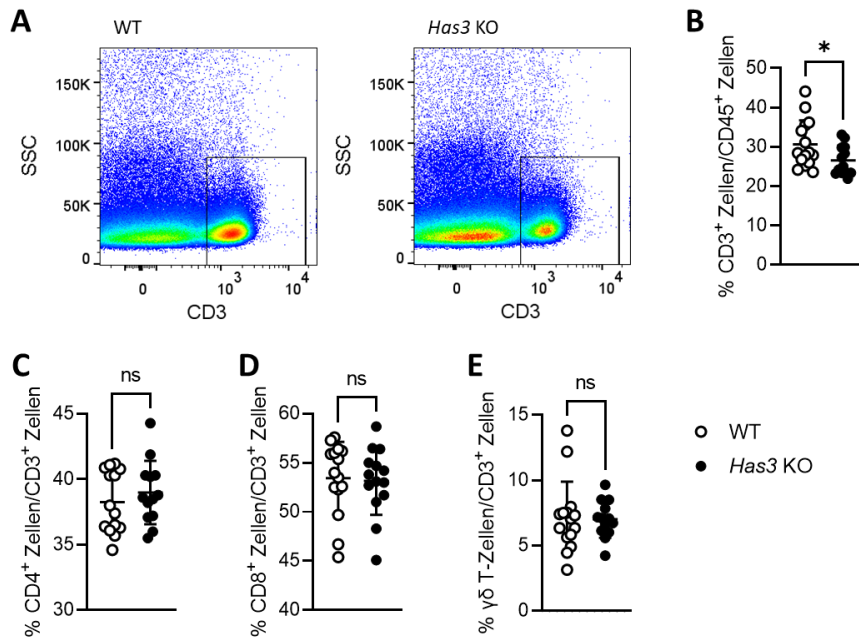


Abbildung 38: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten 7 d nach Infarkt.

Die mediastinalen Lymphknoten von Wildtyp-Tieren (WT) und *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) wurden 7 d nach Infarkt durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die relativen Anteile an (B) den Gesamtleukozyten bzw. (C-E) den Gesamt-T-Zellen. **A.** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der CD3⁺ Zellen in den Lymphknoten. **B.** T-Zellen, **C.** T-Helferzellen, **D.** zytotoxische T-Zellen und **E.** $\gamma\delta$ T-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=15, 13; *p<0,05.

3.6.5.4 Blut

Neben den lokalen Organen der T-Zell-Aktivierung war ebenfalls von Interesse, ob eine Beeinflussung der systemischen Inflammation gegeben war. Daher wurden auch die T-Zell-Subtypen im Blut analysiert. Hierbei ergaben sich zunächst keine Unterschiede in den absoluten Zellzahlen (siehe Abbildung 39).

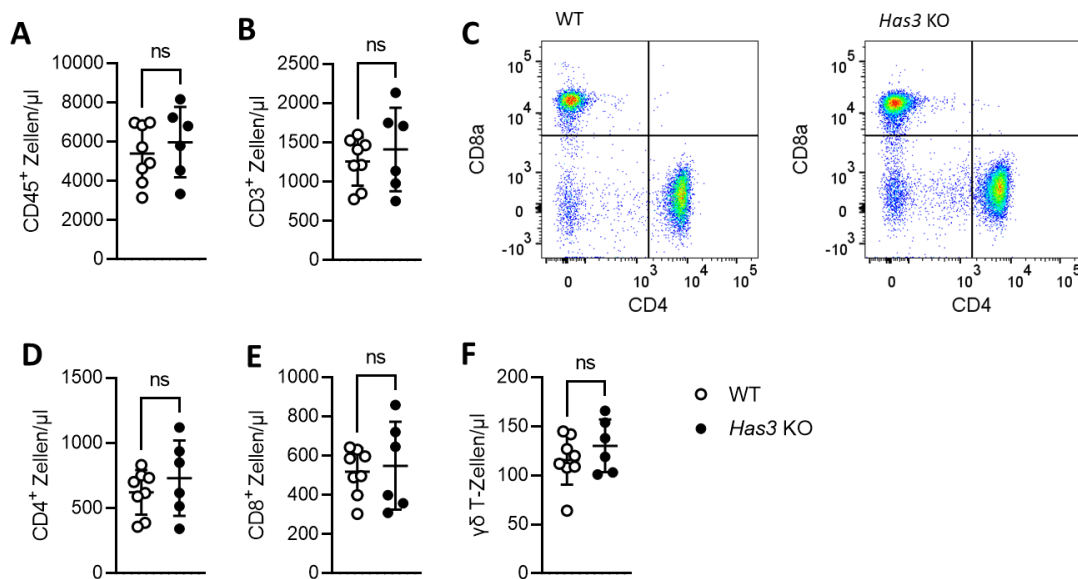


Abbildung 39: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten im Blut 7 d nach Infarkt. Die T-Zellen im kardialen Blut von Wildtyp-Tieren (WT) und *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) wurden 7 d nach Infarkt durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen pro μL Vollblut. **A.** Leukozyten, **B.** T-Lymphozyten, **C.** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der $\text{CD}3^+$ Zellen im Blut. **D.** T-Helferzellen, **E.** zytotoxische T-Zellen und **F.** $\gamma\delta$ T-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; $n=8, 6$.

Allerdings ergab die Subtypen-Analyse bestimmte Unterschiede. Hier zeigte sich im Blut der *Has3* KO Tiere eine signifikante Erhöhung der Th17-Zellen pro μL Vollblut (siehe Abbildung 40 E). Die Th1- und Treg-Zellen waren zwar auch erhöht, aber nicht signifikant (beide $p = 0,07$) (siehe Abbildung 40 A, G). Insgesamt zeigte sich eine Verteilung, die der der Zellen im Herz entgegengesetzt war. Neben der Aktivierung wären damit auch Unterschiede in der Migration als Ursache der veränderten Zellzahlen im Herzen denkbar.

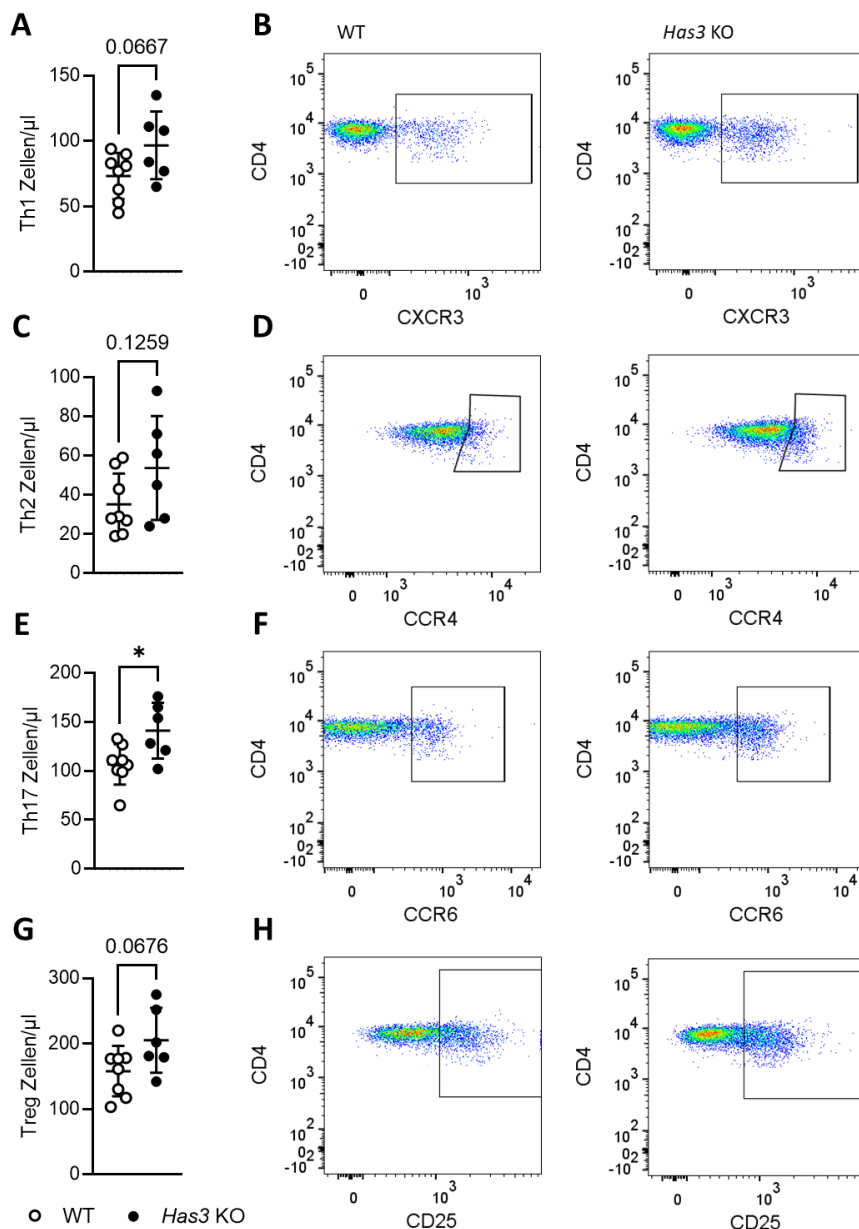


Abbildung 40: Durchflusszytometrische Analyse der T-Helferzell-Subpopulationen im Blut 7 d nach Infarkt.

Die T-Helferzellen im Blut von Wildtyp-Tieren und *Has3*-defizienten Tieren (*Has3* KO) wurden 7 d nach Infarkt durchflusszytometrisch gemäß ihren Subtypen charakterisiert. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen pro μ L Vollblut und die zugehörigen repräsentativen durchflusszytometrischen Plots. **A.** Th1-Zellen (CXCR3⁺) mit **B.** repräsentativen Plots. **C.** Th2-Zellen (CCR4⁺) mit **D.** repräsentativen Plots. **E.** Th17-Zellen (CCR6⁺) mit **F.** repräsentativen Plots. **G.** Treg-Zellen (CD25⁺) mit **H.** repräsentativen Plots. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=8, 6; * $p < 0,05$.

3.7 Mechanistische Untersuchungen isolierter T-Lymphozyten *in vitro*

Nachdem in den durchflusszytometrischen Experimenten 7 d nach Infarkt eine verminderte Zahl von T-Zellen im Herz nachgewiesen werden konnte, sollten im nächsten Schritt die Ursachen näher untersucht werden. Hierzu wurden *in vitro* Experimente mit isolierten T-Zellen durchgeführt. Die T-Zellen wurden dazu mithilfe eines Isolationskits aus der Milz naiver Mäuse gewonnen und anschließend in der Zellkultur weiter untersucht. Die Aktivierung der Zellen erfolgte durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors mittels CD3- und CD28-Antikörpern. Anschließend wurde die mRNA aus den Zellen gewonnen und qPCR-Analysen durchgeführt. Ziel war es einerseits zu prüfen, ob und welche HASen und HA-Rezeptoren durch die T-Zell-Aktivierung heraufreguliert werden. Andererseits sollte untersucht werden, welche Auswirkungen eine *Has3*-Defizienz auf die Aktivierbarkeit der T-Zellen hat. In einem ersten Versuch wurde überprüft, ob die verwendeten Bedingungen dazu geeignet sind, eine Aktivierung von T-Zellen herbeizuführen. Hierzu wurden WT-T-Zellen aus der Milz isoliert und *in vitro* stimuliert. Anschließend wurde die Expression von *Il2* und *IFN γ* in unstimulierten und stimulierten Zellen verglichen. Von beiden Genen ist eine Heraufregulation infolge der Aktivierung bekannt.¹⁵⁴ Für beide Gene konnte eine deutlich verstärkte Expression nach Stimulation gezeigt werden (siehe Abbildung 41).

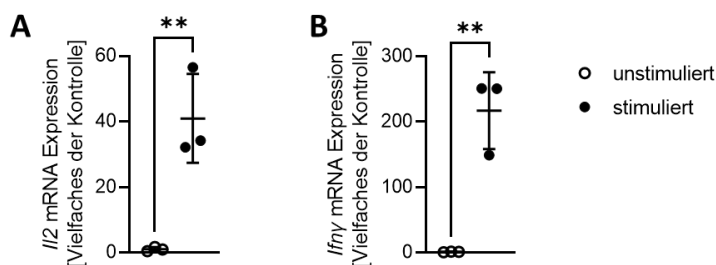


Abbildung 41: Nachweis der Aktivierung in stimulierten T-Zellen.

T-Zellen wurden aus der Milz von WT-Mäusen gewonnen und für 4 h *in vitro* mit CD3/CD28 Antikörpern (1 μ g/mL CD3; 5 μ g/mL CD28) stimuliert. Anschließend wurde die Expression der Aktivierungsmarker *Il2* und *Ifn γ* mittels qPCR untersucht. Die Expression ist als Vielfaches der unstimulierten Kontrolle angegeben. **A.** *Il2*, **B.** *Ifn γ* . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=3, 3.

3.7.1 Expressionsanalyse der Hyaluronsäuresynthasen in T-Lymphozyten

Zunächst sollte die Expression der HASen und ihre Regulation infolge einer T-Zell-Aktivierung untersucht werden. Hierzu wurden die isolierten Zellen von WT-Mäusen für 4h stimuliert und anschließend die Expression der HASen mittels Taqman qPCR untersucht. Von den drei HAS-Isoformen war einzig *Has3* in den Zellen detektierbar. Eine Regulation infolge der Stimulation konnte nicht gezeigt werden (siehe Abbildung 42 A-C). In einem weiteren Experiment wurde auch die Expression in *Has3*-defizienten Tieren untersucht. Hierzu wurden Zellen aus WT- und *Has3* KO Tieren gewonnen und ebenfalls *in vitro* stimuliert. Auch nach Stimulation konnte keine *Has3* Expression in den *Has3* KO Tieren nachgewiesen werden (siehe Abbildung 42 D).

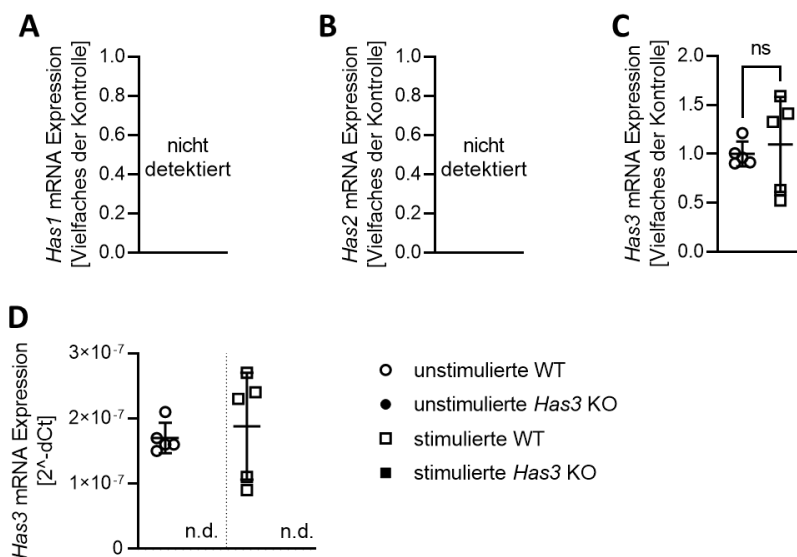


Abbildung 42: Expressionsanalyse der Hyaluronsäuresynthasen in kultivierten T-Zellen. T-Zellen wurden aus der Milz von WT-Mäusen gewonnen und für 4 h *in vitro* mit CD3/CD28 Antikörpern (1 µg/mL CD3; 5 µg/mL CD28) stimuliert. Anschließend wurde die Expression der Hyaluronsäuresynthasen mittels qPCR untersucht. Die Expression ist als Vielfaches der unstimulierten Kontrolle bzw. $2^{-\text{dCt}}$ angegeben. **A.** *Has1*, **B.** *Has2*, **C.** und **D.** *Has3*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=5, 5. n.d.: nicht detektiert.

3.7.2 Expressionsanalyse von Hyaluronsäurerezeptoren in T-Lymphozyten

Neben den HASen wurde auch die Regulierung der wichtigsten HA-Rezeptoren nach Stimulation untersucht. Im Einzelnen wurde die Veränderung der Expression von *CD44*, *Hmmer*, *Lyve1*, *Stab1*, *Stab2* und *Susd5* in stimulierten T-Zellen untersucht. Dabei konnte eine signifikante Hochregulation der *CD44* mRNA nach Stimulation beobachtet werden (siehe Abbildung 43 A). Eine Regulation von *Hmmer* wurde nicht festgestellt (siehe Abbildung 43 B). Die weiteren Rezeptoren waren nicht in T-Zellen nachweisbar (siehe Abbildung 43 C-F).

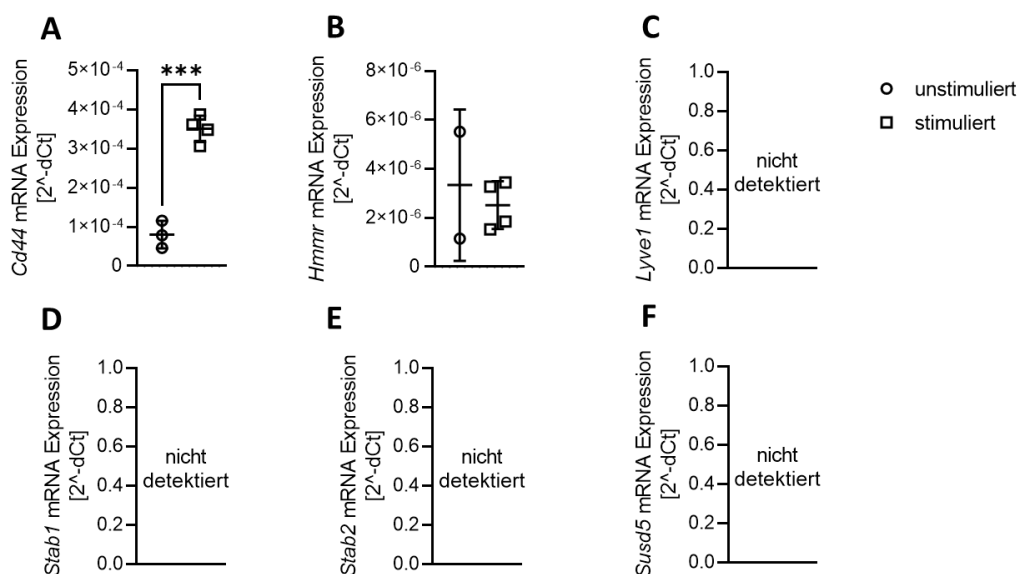


Abbildung 43: Expressionsanalyse der HA-Rezeptoren in kultivierten T-Zellen.

T-Zellen wurden aus der Milz von WT-Mäusen gewonnen und für 4 h *in vitro* mit CD3/CD28 Antikörpern (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CD3; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CD28) stimuliert. Anschließend wurde die Expression der HA-Rezeptoren mittels qPCR untersucht. Die Expression ist als $2^{-\Delta\text{Ct}}$ -Wert angegeben. **A.** *Cd44*, **B.** *Hmmer*, **C.** *Lyve1*, **D.** *Stab1*, **E.** *Stab2*, **F.** *Susd5*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=3, 4.

3.7.3 Untersuchung der Aktivierung *Has3*-defizienter T-Lymphozyten

Da als Ursache für die verminderten T-Zell-Zahlen im Herzen eine veränderte Aktivierung in Betracht kam, wurde die Aktivierbarkeit *in vitro* untersucht. Es ist bekannt, dass HA wichtig für die Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen ist. Bei Behandlung mit 4-MU kommt es zu einer verminderten Aktivierung.^{124, 155} Da *Has3* die dominante Isoform in T-Zellen ist, sollte untersucht werden, ob ein vergleichbarer Effekt bei den *Has3* KO T-Zellen beobachtbar ist. Hierzu wurde wiederum die Expression der

Aktivierungsmarker *Il2* und *Ifny* untersucht. Um Unterschiede nicht durch eine zu starke Aktivierung der Zellen zu maskieren, wurden neben der bisherigen Antikörper-Konzentration noch zwei weitere, niedrigere Konzentrationen verwendet. Trotz einer deutlichen Aktivierung konnten keine Expressionsunterschiede zwischen WT- und *Has3* KO Zellen gezeigt werden (siehe Abbildung 44).

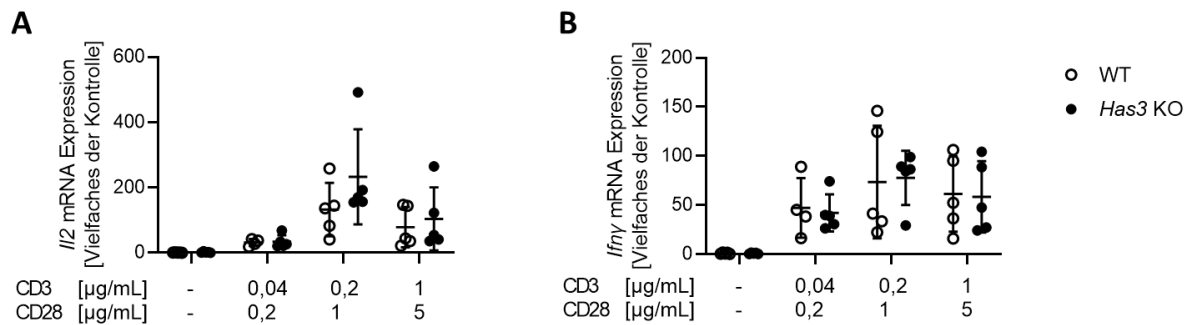


Abbildung 44: Analyse der Aktivierung von WT- und *Has3* KO T-Zellen *in vitro*.

T-Zellen wurden aus der Milz von WT- und *Has3* KO Mäusen gewonnen und für 4 h in 3 Stärken *in vitro* stimuliert. Anschließend wurde die Expression der Aktivierungsmarker *Il2* und *Ifny* mittels qPCR untersucht. Die Expression ist als Vielfaches der unstimulierten WT-Kontrolle angegeben. **A.** *Il2*, **B.** *Ifny*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=5, 5.

3.7.4 Immunzytochemische Untersuchung von HA und CD44 in T-Lymphozyten

Neben der Analyse der Aktivierung wurden auch immunzytochemische Färbungen für HA und CD44 durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen wie zuvor isoliert, jedoch für 24 h stimuliert. Anschließend wurden HA und CD44 mittels HabP und einem CD44-Antikörper angefärbt. Die HA- und CD44-Menge wurde mit ImageJ in den gewonnenen Fluoreszenzbildern quantifiziert. Dabei konnten signifikante Reduktionen von HA und CD44 gezeigt werden (siehe Abbildung 45).

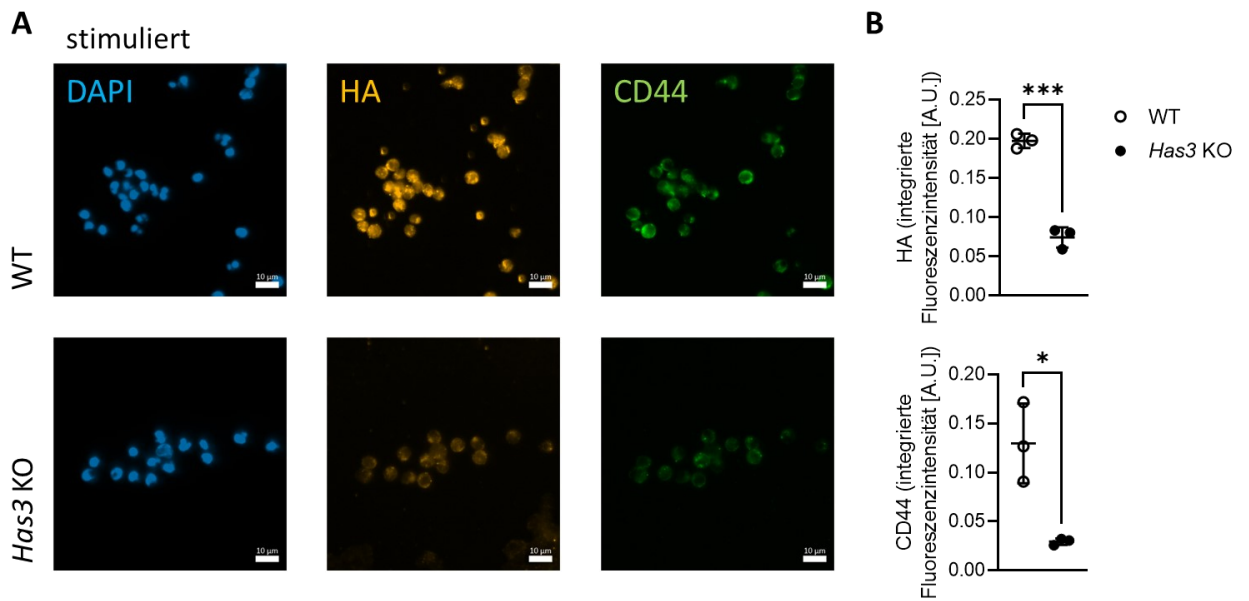


Abbildung 45: Immunzytochemische Quantifizierung von HA und CD44 in stimulierten T-Zellen.

T-Zellen wurden aus der Milz von WT- und *Has3* KO Mäusen gewonnen und für 24 h *in vitro* mit CD3/CD28 Antikörpern (1 µg/mL CD3; 5 µg/mL CD28) stimuliert. Anschließend wurden HA und CD44 angefärbt und in ImageJ quantifiziert. **A.** Repräsentative Bilder der gefärbten T-Zellen, **B.** Quantifizierung von HA und CD44 in T-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=3, 3.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der HAS3 auf die Heilung nach Myokardinfarkt untersucht. Dazu wurde bei geschlossenem Thorax in *Has3*-defizienten Mäusen und WT-Tieren operativ eine kardiale Ischämie mit anschließender Reperfusion induziert. Anschließend wurden sowohl die Immunantwort als auch die funktionellen und morphologischen Auswirkungen detailliert untersucht.

Die aktuellsten Todeszahlen für Deutschland aus dem Jahr 2019 zeigen nach wie vor kardiovaskuläre Krankheiten als häufigste Todesursache und mit 35 % sogar deutlich vor Krebserkrankungen (25 %)¹. Innerhalb ersterer entfallen wiederum rund 35 % der Fälle auf ischämische Krankheitsbilder.² Trotz weit entwickelter Therapieoptionen bietet die Therapie des Herzinfarkts also immer noch ein großes Verbesserungspotenzial.

Die aktuellen Ansätze fußen vor allem auf der Therapie von Risikofaktoren und der schnellen Revaskularisierung nach MI mit anschließender Sekundärprophylaxe. So werden Risikofaktoren wie Hypercholesterolämie, Diabetes mellitus, Übergewicht und Rauchen pharmakologisch durch Statine, Metformin, etc., aber auch durch Lebensstiländerungen wie Rauchverzicht, sportliche Betätigung und Ernährungsanpassung angegangen. Kommt es dennoch zum MI, liegt der Fokus auf einer möglichst zügigen Wiedereröffnung des okkludierten Gefäßes. Die anschließende Therapie mit ASS bzw. Clopidogrel und Statinen dient vor allem der Sekundärprophylaxe und Offenhaltung eines eingesetzten *Stents*. Außerdem wird die häufig als Folge des MI auftretende Herzinsuffizienz mit ACE-Hemmern, Diuretika, Beta-Blockern, etc. therapiert. Trotz dieser Optionen, die die Todesraten unter MI minimieren und die Lebensqualität des Patienten post Infarkt maximieren, ist ein schädliches *Remodeling* des Herzens meist nicht zu vermeiden. Therapeutische Ansätze dazu gibt es kaum.

HA spielt als Matrixmolekül eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunreaktion. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HAS3 die T-Zell-Antwort beeinflusst. Weitere Studien werden zeigen müssen, ob HAS3 als therapeutische Zielstruktur adressierbar ist.

4.1 Einfluss des *Has3* KO auf die kardiale HA-Matrix

Zu Beginn der Arbeit wurde das genetische Modell validiert. Da es sich um einen konstitutiven KO der *Has3* handelt (siehe Abbildung 5), war von einer hohen Effizienz auszugehen. Zur Kontrolle wurden die Vorhöfe, als Teil des Herzens und damit des untersuchten Organs, und die Blase untersucht. Die Blase wurde dabei gewählt, da hier, neben dem zentralen Nervensystem, die höchste Expression von *Has3* zu erwarten ist.¹⁴¹ Dabei konnte in beiden Organen ein stabiler *knockout* gezeigt werden, in dem die *Has3*-Expression in einigen Tieren sogar unter die Nachweisgrenze abgesenkt war (siehe Abbildung 6). Im nächsten Schritt war von Interesse, ob sich das Fehlen der HAS3 auch auf die HA-Matrix im Herzen auswirkt. Dazu wurde die HA histologisch mit HAbP angefärbt (siehe Abbildung 7). Dabei zeigten sich, anders als beim KO von *Has2*¹³⁴, keine Unterschiede. Jedoch ist bekannt, dass *Has2* die vorherrschende *Has*-Isoform im Herzen ist.⁹³ Der wichtigste Zelltyp für die Matrixproduktion im Herz sind Fibroblasten.^{156, 157} Für diese konnte gezeigt werden, dass *Has2* die dominante Isoform darstellt, während *Has1* und *Has3* nur gering exprimiert sind.¹³⁴ Es ist somit plausibel, dass die *Has3*-Defizienz keinen messbaren Einfluss auf die kardiale HA-Matrix hat. Dabei können allerdings strukturelle Änderungen der HA Matrix nicht ausgeschlossen werden. Da *Has3* außerdem die am stärksten exprimierte Isoform in zirkulierenden Leukozyten ist¹⁰⁷, sind Effekte auf die Heilung des Herzens weiterhin wahrscheinlich.

4.2 Kardiale Funktion und Narbenbildung

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die *Has3*-Defizienz Auswirkungen auf die kardiale Funktion und Heilung nach Herzinfarkt hat. Wie in 2.1.2 beschrieben, wird hierbei zunächst in einer Vor-OP eine Ligatur angelegt und anschließend bei geschlossenem Thorax die Ischämie induziert. Hierdurch werden einerseits die inflammatorischen Stimuli von Thoraxöffnung und Ischämie entkoppelt¹⁵⁸, andererseits kommt dies auch dem Infarktgeschehen im Menschen deutlich näher. Die Narbengröße wurde 3 w nach Ischämie in Gomori und Pikrosiriusrot gefärbten Herzen untersucht (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9). Beide Auswertungen zeigten signifikant größere Narben im *Has3* KO. Daneben wurde die kardiale Funktion mittels Echokardiografie im Zeitverlauf analysiert.¹³⁶ Während die Tiere vor Infarkt keine Unterschiede aufwiesen, zeigte sich eine signifikant verschlechterte LVEF 2 w und 3 w nach Infarkt (siehe Abbildung 11). Diese beiden Beobachtungen gingen, wie erwartet, miteinander

einher. Nach einem MI werden die abgestorbenen Kardiomyozyten durch eine kollagenreiche Narbe ersetzt. Diese hat keine kontraktilen Fähigkeiten, was zu einer schlechteren kardialen Funktion führt, je größer das Narbenareal ist.¹⁵⁹

Zudem wurde in den Pikrosiriusrot gefärbten Herzen eine Analyse der Kollagendichte durchgeführt. Aufgrund seiner stark anionischen linearen Struktur lagert es sich an die basischen Kollagenfasern an und verstärkt deren Doppelbrechung. Dabei erscheinen in polarisiertem Licht dicht gepackte Bündel rot, lose gepackte grün.¹⁶⁰ Die Auswertung zeigte keine Unterschiede in der Packungsdichte in den Herzen von *Has3*-defizienten Tieren (siehe Abbildung 10). Die Stabilität der Narbe wurde nicht näher untersucht. Es wurden jedoch in keiner Gruppe Herzrupturen festgestellt, die auf eine geringe Stabilität hätten schließen lassen. Eine experimentelle Messung der *tension to rupture* könnte Aufschluss darüber geben, ob sich die Kollagendichte auch auf die Stabilität der Narbe auswirkt.¹⁶¹

4.3 Hypertrophie

Neben der verschlechterten kardialen Funktion konnte im Echo auch eine Erhöhung der linksventrikulären Masse nach 3 w beobachtet werden. Dieser Befund konnte histologisch durch Auswiegen der Herzen 3 w nach Infarkt bestätigt werden (siehe Abbildung 12). Dies legte die Vermutung eines hypertrophen Phänotyps nahe. Allerdings ist auch bekannt, dass es infolge des MI zu kardialer Ödembildung kommt, die ebenfalls für die Gewichtsunterschiede verantwortlich sein könnte.¹⁶² Daher wurde zur genaueren Untersuchung der Hypertrophie die Expression der Hypertrophiemarker ANP und BNP im *remote* Bereich des Herzens untersucht.^{163, 164} Diese werden vom Herzen als Reaktion auf erhöhte Dehnung freigesetzt und wirken natriuretisch, diuretisch und vasodilatierend.¹⁶⁵ Mit Sacubitril (Entresto®) befindet sich seit 2015 sogar ein Inhibitor von Nephrylysin, dem ANP/BNP abbauenden Enzym, zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz auf dem Markt.¹⁶⁶ qPCR Analysen der Herzen 3 w nach Infarkt zeigten eine signifikant erhöhte Expression von BNP (siehe Abbildung 13). Als weiterer Beleg der kardialen Hypertrophie wurde die Kardiomyozytengröße in WGA gefärbten Herzen untersucht. Diese kann als Charakteristikum der Hypertrophie herangezogen werden.^{140, 167} Die durchgeführte Messung zeigte eine signifikante Vergrößerung der Kardiomyozyten (siehe Abbildung 14). Um auszuschließen, dass es sich um einen kongenitalen Effekt des *Has3* KO handelt, wurde auch eine Bestimmung

der Kardiomyozytengröße in naiven Tieren vorgenommen. Hier zeigten sich keine Unterschiede bzgl. der Kardiomyozytengröße, wodurch sich ein basaler Effekt der HAS3 ausschließen lässt (Daten nicht gezeigt). Aus der Literatur ist bekannt, dass eine verringerte Ejektionsfraktion nach MI mit einer erhöhten linksventrikulären Masse einhergehen kann. So konnten Nahrendorf et al. zeigen, dass durch Inhibition der Myeloperoxidase nicht nur die LVEF nach 3 w um 44 % verbessert ist, sondern dies auch mit einer um 33 % verringerten LV Masse einhergeht.⁴³ Andererseits ist von Epelman et al. beschrieben, dass die Depletion residenter Makrophagen zu einer erhöhten Hypertrophie, jedoch nicht zu Änderungen der kardialen Fibrose oder der LVEF führen.¹⁴⁰ Aus den durchgeführten Analysen lassen sich keine Rückschlüsse auf den Grund für die Hypertrophie ziehen. So ist es möglich, dass es aufgrund der *Has3*-Defizienz zu größeren Infarkten kommt und infolgedessen das verbleibende gesunde Myokard kompensatorisch hypertrophiert. Ebenso wäre es möglich, dass die *Has3*-Defizienz unmittelbar die Hypertrophie begünstigt. Zur Klärung dieser Frage wären intraventrikuläre Druckmessungen notwendig, die zeigen, ob in den *Has3* KO Tieren ein erhöhter Druck vorliegt, der Ursache für die Hypertrophie sein könnte.

4.4 Fibroblasten

Neben den Immunzellen wurde auch die Fibroblastenantwort 72 h und 7 d nach Infarkt charakterisiert. Während 7 d nach Infarkt keine Unterschiede in Histologie und FACS festgestellt werden konnten (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19), wurde 72 h nach Infarkt histologisch eine verminderte Expression von α -SMA gezeigt (siehe Abbildung 16). Ursächlich hierfür könnte eine verminderte Aktivierung durch eine geringere Stimulation mit T-Zell-sekretiertem IFN γ sein.⁴⁰ Für die globaleren Marker CTHRC1 und POSTN konnten keine Unterschiede gefunden werden. Beides sind jedoch sekretierte Proteine. Fibroblasten befinden sich 72 h nach Infarkt vor allem in einer proliferativen Phase, in der die Sekretion noch nicht im Vordergrund steht und daher die Unterschiede möglicherweise noch nicht zu sehen sind. Die Tatsache, dass 7 d nach Infarkt keine Veränderungen mehr zu sehen sind, spricht für eine verzögerte Aktivierung der Fibroblasten nach Infarkt. Dies könnte zur vergrößerten Narbe beitragen, da so der Infarktbereich erst später kontrahiert und mit provisorischer Matrix gefüllt wird und mehr Zeit für die Schädigung bleibt. In Anzahl, Proliferation und Apoptose wurden weder 72 h noch 7 d nach Infarkt Unterschiede gezeigt (siehe Abbildung 17, Abbildung 19).

4.5 Immunantwort

In dieser Arbeit konnte die Bedeutung der *Has3* für die Immunzellantwort, hier die T-Zell-Antwort, nach MI gezeigt werden. Frühere Arbeiten unserer Gruppe zeigten bereits die Relevanz von *Has2* für die Makrophagenantwort.¹³⁴ Ebenso wurde zuvor der Einfluss der *Has3* auf die T-Zell-Antwort in der Atherosklerose gezeigt.⁹² Bollyky et al. haben auf dem Feld der HA und T-Zellen im Kontext von T1DM diverse Arbeiten publiziert.^{107, 124, 168, 169} Dies unterstreicht die vielfältige Rolle von HA in unterschiedlichen Krankheitsmodellen und für verschiedenste Immunzellen. Die Bedeutung von HA in verschiedenen inflammatorischen Krankheiten wurde in der Vergangenheit ausführlich beschrieben.¹⁷⁰⁻¹⁷² Daher wurde die Immunantwort nach MI detailliert untersucht.

4.5.1 Basal und 72 h nach Infarkt

Da basale Effekte in einem konstitutiven KO nicht ausgeschlossen werden können, wurden im Blut zunächst die zirkulierenden Immunzellen durchflusszytometrisch gemessen (siehe Abbildung 20). Dabei konnte gezeigt werden, dass es keine basalen Unterschiede zwischen den Genotypen gibt. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass für die basale Untersuchung Blut aus der Schwanzspitze verwendet wurde. Alle weiteren Untersuchungen wurden mit kardialem Blut durchgeführt. Daher sind die Zellzahlen der Basalmessung nicht mit denen der sonstigen Messung vergleichbar. Es wurde berichtet, dass die Entnahmemethode signifikante Unterschiede auf die Zellzahlen im Blut hat. So wurden im Schwanzspitzenblut rund drei Mal so viele Leukozyten gemessen, wie in kardialem Blut.¹⁷³ Da jedoch für beide Genotypen die gleiche Methode verwendet wurde, können basale Effekte in den zirkulierenden Leukozyten dennoch ausgeschlossen werden.

Anschließend wurden die myeloiden Zellen 72 h nach Infarkt in Blut und Milz untersucht (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22). Hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Die Hämatopoese findet vor allem in Knochenmark und Milz statt. Beim Infarkt wandern die Zellen ins Blut aus, um zum infarzierten Herz zu gelangen. Dabei setzt die Milz rund 50 % der myeloiden Zellen frei.^{146, 174} Es kann also davon ausgegangen werden, dass durch die *Has3*-Defizienz keine Unterschiede in der Bildung und Freisetzung der myeloiden Zellen nach MI entstehen.

Neben Blut und Milz wurden auch die Populationen im Herzen genauer untersucht. Zunächst wurden histologische Färbungen der Marker MAC-2 und CD68 angefertigt (siehe Abbildung 23). Hier zeigten sich keine Unterschiede in den Gesamtmakrophagen. Zu erwähnen ist, dass für die Färbung und die spätere durchflusszytometrische Analyse unterschiedliche Marker verwendet wurden, die zur Detektion von Makrophagen dienen können.¹⁷⁵ So konnten in der Färbung keine Subtypen abgebildet werden. Petz et al. konnten jedoch in der Vergangenheit zeigen, dass durch *Has2*-Defizienz nicht alle Subpopulationen betroffen sind, sondern nur Monozyten-differenzierte Makrophagen und residente MHCII^{high} Makrophagen.¹³⁴ Daher sollten die Subgruppen durchflusszytometrisch genauer untersucht werden. Dabei wurde anhand der Marker CD64, CCR2 und MHCII in Monozyten und drei Makrophagen-Subgruppen unterschieden. Eine erste Übersicht zeigte dabei keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 24). Die genauere Auswertung der Subgruppen zeigte eine signifikant erhöhte Zahl von proinflammatorischen Monozyten-differenzierten Ly6C^{high} Makrophagen (siehe Abbildung 26), während die weiteren Subtypen keine Veränderungen zeigten (siehe Abbildung 25, Abbildung 27 und Abbildung 28). Neben der reinen Quantifizierung der Populationen wurde mittels BrdU Inkorporation und Färbung von Phosphatidylserin mit Annexin V ebenfalls die Proliferation und Apoptose bestimmt. Es konnte eine im Trend geringere Apoptose der genannten Subgruppe beobachtet werden, was ein möglicher Grund für die erhöhte Zellzahl sein könnte. Es ist bekannt, dass Ly6C^{high} Makrophagen in der Frühphase nach MI zur weiteren Schädigung des Herzens beitragen können.^{176, 177} Dies wäre ein denkbarer Grund für die vergrößerte Narbe 3 w nach Infarkt. Daneben setzen Ly6C^{high} Makrophagen IFN γ frei.¹⁷⁸ Yan et al. haben beschrieben, dass IFN γ die TGF β vermittelte α -SMA-Expression in Fibroblasten herabreguliert.⁶⁴ In Einklang damit konnte 72 h nach Infarkt histologisch eine geringere α -SMA-positive Fläche im Herzen gezeigt werden, was eine verminderte Myofibroblastendifferenzierung nahelegt (siehe Abbildung 16). Außerdem produzieren Makrophagen IL6.¹⁷⁹ Von diesem Interleukin ist bekannt, dass es die Entwicklung und Funktion von Treg unterdrückt. Des Weiteren fördert es die Differenzierung von IL17 sekretierenden Th17 Zellen. Hierzu sind jedoch noch weitere Zytokine (z.B. TGF β) erforderlich.¹⁷⁹ Dies könnte einen Beitrag zur verringerten Anzahl der Treg 7 d nach MI leisten, während die Th17-Zellen nicht beeinflusst sind.

Neben dem angeborenen Immunsystem wurde auch das adaptive Immunsystem näher untersucht, genauer gesagt die T-Zellen inklusive der wichtigsten Subtypen (Th1, Th2, Th17, Treg) und die Aktivierung *in vivo* (CD44, CD62L, CD69) (siehe 1.2.2.3).

Während das angeborene Immunsystem und seine Rolle im MI bereits intensiv untersucht wurden, ist über das adaptive Immunsystem in diesem Kontext eher wenig bekannt. Dabei ist dies hier von besonderem Interesse, da sowohl eine Verbindung zwischen *Has3* und T-Zellen als auch die Rolle von T-Zellen im Herzinfarkt in der Vergangenheit beschrieben wurden. So ist aus Arbeiten im Atherosklerosemodell unserer Gruppe bekannt, dass die Expression von *Has3* durch IL1 β induziert werden kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion von *Has3* die Th1 Polarisierung inhibiert wird.^{92, 180} Bollyky et al. haben unabhängig vom MI den Einfluss von HA auf T-Zellen erforscht. Dabei konnten sie nachweisen, dass hochmolekulare HA die Treg-Funktion unterstützt und über Quervernetzung von CD44 die Expression von FoxP3 steigert.^{181, 182} Außerdem zeigten sie, dass von dendritischen Zellen produzierte HA die Proliferation von T-Zellen unterstützt.^{107, 183} Dieser Effekt scheint unabhängig von CD44 zu sein, da eine Rezeptorblockade mit CD44-Antikörpern die Proliferation nicht beeinflusste.¹⁸³ Für die Adhäsion und Transmigration ist CD44 hingegen relevant.¹⁶⁹ Die Expression von CD44 wurde durch Inhibition der HA-Produktion nicht beeinflusst.¹⁶⁹ Außerdem konnte eine Rolle von HA in der T-Zell-Aktivierung nachgewiesen werden. So zeigen T-Zellen, deren HA-Synthese mittels 4-MU inhibiert ist, eine geringere Aktivierung bei Kontakt mit APC.¹⁵⁵ Ob die Aktivierung nach Stimulation mit CD3/CD28-Antikörpern beeinträchtigt wird, geht aus den Arbeiten nicht eindeutig hervor.^{124, 169}

Auch die bekannten Effekte von T-Zellen im MI sollen kurz thematisiert werden. So ist beschrieben, dass in der akuten Phase nach Infarkt zunächst Th1 und CD8⁺ T-Zellen dominieren. Beide Zelltypen produzieren nach Aktivierung entzündungsfördernde Zytokine einschließlich TNF α und IFN γ , wobei besonders die IFN γ -sekretierenden Th1 Zellen mit Kardiomyozytenapoptose und verringerter Myofibroblastendifferenzierung assoziiert sind.¹⁴⁵ In der chronischen Phase dominieren dann Th2, Th17 und Treg.¹⁴⁵ Zur Untersuchung der Rolle von T-Zellen liegen verschiedene KO Modelle vor. In einer der Studien führte der KO von CD4 zu einer Beeinträchtigung der Wundheilung, einer gesteigerter LV Dilatation, einer gestörten Kollagen-Matrix Bildung und einer gesteigerten Monozytenexpansion.^{40, 63} Im Gegensatz dazu ist aber auch beschrieben, dass ein CD4 KO, aber kein CD8 KO, zu kleineren Infarkten führt, was auf den Beitrag von IFN γ zum Ischämie/Reperfusionsschaden zurückgeführt wird.¹⁵¹ Auch MHCII KO Mäuse, RAG-KO Mäuse und CD4 OTII Tiere, deren T-Zell-Rezeptor nur auf Hühner-Ovalbumin reagiert, weisen kleinere Infarkte auf.^{40, 184}

Ein besonderes Augenmerk der Forschung liegt zurzeit auf den Tregs, da ihre anti-inflammatorische Funktion und damit positive Auswirkung auf das kardiale Remodeling in mehreren Studien gezeigt wurde.^{68, 69, 185} Zum Beispiel wurde in Treg defizienten Mäusen eine größere Narbenbildung nach Infarkt sowie eine erhöhte Anzahl proinflammatorischer M1 Makrophagen festgestellt. Eine verringerte Myofibroblastenaktivierung wurde außerdem mit dem Fehlen von Treg-produziertem TGF- β in Verbindung gebracht.⁶⁹ In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Tregs die interstitielle Fibrose und kardiale Apoptose vermindern sowie *in vitro* Kardiomyozyten vor LPS-induzierter Apoptose schützen.^{68, 185}

Wenngleich diese Studien eine protektive Funktion der Tregs im MI nahelegen, ist ihre Rolle nicht abschließend geklärt. So konnte gezeigt werden, dass es bei Rekonstitution eines CD4 KO Tieres mit CD4⁺ Zellen nur zu größeren Infarkten kommt, wenn Tregs enthalten sind. Eine Depletion von Treg führte zu kleineren Infarkten.¹⁸⁴ Dabei wurde deutlich, dass es neben den ‚klassischen‘ CD4⁺Foxp3⁺ Tregs auch eine IFN γ -produzierende und damit entzündungsfördernde Subpopulation von CD4⁺Foxp3⁺ Zellen gibt, die gerade in der frühen Phase nach MI von Bedeutung ist. Andere Gruppen beschreiben keine Auswirkungen einer Treg Depletion auf die kardiale Funktion und Narbengröße, aber eine reduzierte α -SMA Expression in Fibroblasten durch Tregs.⁶⁷

In der Analyse der T-Lymphozyten im Blut 72 h nach Infarkt konnten zunächst keine Unterschiede in der absoluten Anzahl der CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 29). Eine Betrachtung der Marker CD62L und CD44 zeigte allerdings eine Verschiebung in den relativen Anteilen der naiven und der Effektor-T-Zellen (siehe Abbildung 30). Dabei erhöhte sich der Anteil der Effektorzellen um rund 5 % zu Lasten der naiven T-Zellen. Möglicherweise ist eine verstärkte Aktivierung die Ursache dafür. Daher wurden nachfolgend auch die Orte der Aktivierung – Milz und Lymphknoten – untersucht. Hier zeigten sich in der Milz signifikante Reduktionen aller T-Zell-Subtypen pro mg (siehe Abbildung 31). Was zunächst wie ein realer Effekt erscheint, ist aber wahrscheinlich nur ein rechnerisches Phänomen. Neben den veränderten Zellzahlen wurde nämlich auch ein erhöhtes Milzgewicht beobachtet (siehe Abbildung 31). Eine Betrachtung der Daten ohne Normalisierung auf das Milzgewicht zeigte keine Unterschiede in den Zellzahlen. Erst durch die Normalisierung auf die unterschiedlich schweren Organe ergaben sich die Unterschiede. Dabei liegt die Ursache für das erhöhte Gewicht vermutlich in einer Ödembildung infolge der Herzinsuffizienz.¹⁵⁰ Die Effekte kommen daher wahrscheinlich durch eine Art

„Verdünnung“ der Immunzellen durch das Ödem zustande. Auch die Aktivierung wurde untersucht. Dort konnten aber keine Unterschiede festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). In Lymphknoten und Herzen wurden 72 h nach Infarkt keine Unterschiede beobachtet.

4.5.2 7 d nach Infarkt

Die T-Zellen wurden ebenfalls zum Zeitpunkt 7 d nach Infarkt untersucht. Dabei wurden im Herz weniger CD4⁺ und CD4⁺CD8⁻ Zellen gefunden (siehe Abbildung 34). In letztgenannter Gruppe finden sich neben $\gamma\delta$ T-Zellen auch regulatorische CD4⁺CD8⁻ T-Zellen.¹⁸⁶ Die detailliertere Analyse ergab, dass vor allem Th1- und Treg-Zellen für die Reduktion verantwortlich waren (siehe Abbildung 35). Auch die Aktivierung war gehemmt. So zeigten sich reduzierte Zahlen von CD69⁺ Zellen und Effektorzellen (siehe Abbildung 36). Es ist bekannt, dass ein *Has3* KO wie auch die Behandlung mit 4-MU die Funktion der T-Zellen beeinflusst.⁹⁶ In der Atherosklerose wurde gezeigt, dass der KO zu einer verminderten Th1-Differenzierung führt.⁹² Das könnte auch in diesem Fall ein möglicher Grund für die verringerten Th1-Zahlen sein. Außerdem zeigte sich ein entgegengesetzter Effekt im Blut (siehe Abbildung 40). Das könnte auf Probleme in der Verteilung der Zellen, speziell auf eine gehemmte Migration der T-Zellen aus dem Blut ins infarzierte Herz, hinweisen. Auch Endothelschäden wären eine Option, da es sich um einen globalen KO handelt und Arbeiten unserer Gruppe auch eine wichtige Rolle von *Has3* im Endothel nachweisen konnten. *In vitro* Transmigrationsversuche mit T-Zellen aus WT und *Has3*-defizienten Mäusen sind geplant, um herauszufinden, ob der *Has3* KO einen Einfluss auf die Migration durch das Endothel hat. Einen Hinweis könnte die immunzytochemische Färbung von CD44 liefern, die weniger CD44 auf aktivierten T-Zellen zeigte (siehe Abbildung 45). Von CD44 ist bekannt, dass es wichtig für die Adhäsion und Transmigration von T-Zellen ist.^{168, 169, 187} Auch Untersuchungen der Proliferation und Apoptose wären interessant. Beides könnte, falls verändert, ursächlich für die verringerten Zellzahlen sein. Die Milz zeigte keine Reduktion in den Zellzahlen (siehe Abbildung 37). Gemeinsam mit der Tatsache, dass die Zellen im Blut auch nicht reduziert waren, kann davon ausgegangen werden, dass keine Unterschiede in der Hämatopoese oder der Freisetzung der T-Zellen bestehen.

Die Lymphknoten als weiterer Ort der Aktivierung wurden ebenfalls untersucht. Hier konnte ein reduzierter Anteil von T-Zellen an den Leukozyten beobachtet werden. Die Verteilung der Subtypen war unbeeinflusst (siehe Abbildung 38). Eine denkbare Ursache dafür könnte ein Defizit im T-Zell *homing* sein. Auch hierbei spielt CD44 eine Rolle.¹⁸⁷

Weitere Optionen wären ein verminderter Efflux aus dem Herzen oder eine verminderte Proliferation im Lymphknoten selbst.

Für die ordnungsgemäße Heilung nach MI ist eine fein abgestimmte Immunreaktion erforderlich.¹⁵² Auch die T-Zellen unterliegen dabei einer definierten Kinetik.⁵⁸ Die durchgeführten Experimente konnten aufzeigen, dass diese Kinetik in den *Has3* KO Tieren gestört ist. Wie oben ausgeführt, ist die Rolle der Tregs im MI vielfältig und komplex. Dies und die Tatsache, dass eine verschlechterte Heilung beobachtet wurde, legen die Vermutung nahe, dass die Ursache der vergrößerten Narben in der verminderten Anzahl der Tregs liegt.^{68, 69}

4.6 Mechanistische Untersuchungen an T-Zellen *in vitro*

Abschließend wurden noch mechanistische Untersuchungen an isolierten T-Zellen durchgeführt. Dabei wurden T-Zellen aus der Milz naiver WT und *Has3* KO Mäuse isoliert und anschließend in der Zellkultur mit CD3/CD28-Antikörpern stimuliert. In einem ersten Schritt wurde geprüft, ob die Aktivierung suffizient ist. Dazu wurden die Zellen für 4 h aktiviert und anschließend die Expression von *Il2* und *Ifny* mittels qPCR geprüft. Beide sind als Aktivierungsmarker bekannt.^{53, 154, 188} Für beide Gene konnte eine deutliche Heraufregulation gezeigt werden, wodurch die Aktivierung im Modell bestätigt wurde (siehe Abbildung 41). Anschließend sollte das Expressionsmuster der HASen in T-Zellen nach Stimulation untersucht werden. Im Einklang mit der Literatur konnte nur *Has3* nachgewiesen werden.^{92, 169} Darüber hinaus ist beschrieben, dass *Has3* auch die Hauptisoform in dendritischen Zellen und Leukozyten insgesamt darstellt.^{107, 169} Eine Induktion nach Stimulation konnte nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 42).¹³⁴ Nachdem diese Experimente in WT-Zellen durchgeführt worden waren, wurden im nächsten Schritt auch *Has3* KO Zellen untersucht. Dabei wurde zunächst validiert, dass der *Has3* KO in den T-Zellen und der gewählten Taqman qPCR nachweisbar ist. Dies war der Fall und es konnte keine Expression von *Has3* im KO detektiert werden (siehe Abbildung 42). Immunzytologisch wurden HA und CD44 in T-Zellen nach 24-stündiger Stimulation untersucht. Erwartungsgemäß zeigte sich dabei eine Reduktion der perizellulären HA (siehe Abbildung 45). Um herauszufinden, wie HAS3 seine Effekte auf T-Zellen vermittelt, wurde nachfolgend die Expression von HA-Rezeptoren in T-Zellen untersucht (siehe Abbildung 43). Dabei wurden nur *Cd44* und *Hmmr* detektiert. Die anderen Rezeptoren waren nicht detektierbar. Im Gegensatz zu *Hmmr* zeigte CD44 eine Hochregulation in stimulierten Zellen, was aus der Literatur auch bekannt ist.¹⁸⁹ Aufgrund seiner bereits beschriebenen Funktion in T-Zellen¹⁶⁹ und der um zwei

log-Einheiten höheren Expression gegenüber *Hmmr* kann davon ausgegangen werden, dass letzteres eine stark untergeordnete Rolle in T-Zellen spielt. Nach diesen Beobachtungen wurde untersucht, ob durch die *Has3*-Defizienz eine veränderte Aktivierbarkeit der T-Zellen eintritt. Dazu wurden WT und *Has3* KO T-Zellen stimuliert und die Expression von *Il2* und *Ifn γ* untersucht (siehe Abbildung 44). Dabei zeigte sich zwar eine deutliche Aktivierung der Zellen, jedoch keine Unterschiede in den Genotypen. Auch die Expression von *Cd44* wurde bestimmt (Daten nicht gezeigt). Hier ergaben sich auf mRNA-Ebene keine Unterschiede. Auch in der Literatur wurden nach Behandlung von T-Zellen mit 4-MU keine Unterschiede in der *Cd44*-Expression festgestellt.¹⁶⁹ Allerdings konnte in einer immunzytochemischen Färbung gezeigt werden, dass die *Has3*-defizienten Zellen weniger CD44 an ihrer Oberfläche haben (siehe Abbildung 45).

Da *Has3* die einzig detektierbare Isoform in T-Zellen ist und auch gezeigt werden konnte, dass der KO von *Has3* zu einer massiven Reduktion der perizellulären HA führt, ist davon auszugehen, dass es eine Überschneidung der Effekte des *Has3* KO und einer 4-MU-Behandlung in T-Zellen gibt. Bollyky et al. konnten für 4-MU-behandelte T-Zellen eine Hemmung der Aktivierung und Proliferation zeigen.¹⁶⁹ Allerdings wurden dabei die T-Zellen mit dendritischen Zellen stimuliert. Hier war die Bindung zwischen den Zelltypen deutlich beeinträchtigt. Auch die Anzahl von T-Zellen, die an DCs binden, war reduziert. Diese Effekte auf die Aktivierung zeigten sich jedoch nicht bei einer Aktivierung mit CD3/CD28-Antikörpern.¹⁶⁹ Somit kann eine veränderte Aktivierbarkeit der *Has3* KO T-Zellen nicht vollständig ausgeschlossen werden, da sich die Aktivierung über Antikörper von der Aktivierung *in vivo* unterscheidet. HA wird in diesem Kontext als „Kleber“ in der Immunsynapse zwischen DC und T-Zellen beschrieben. Neben der HA-Produktion der T-Zellen ist auch von einer Rolle der DC-sekretierten HA auszugehen.¹⁰⁷

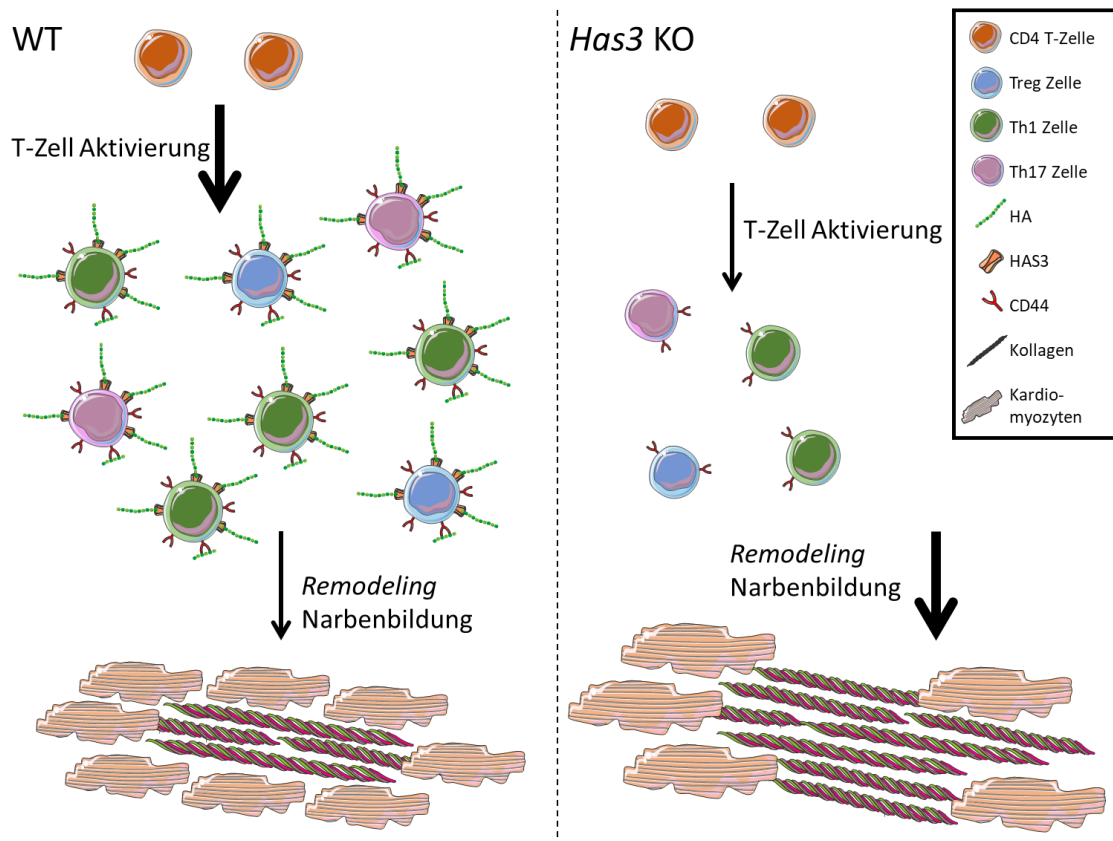


Abbildung 46: Schematische Zusammenfassung der verminderten T-Zell Aktivierung im Herz nach I/R.

In Folge des Myokardinfarktes kommt es zur Aktivierung von CD4 T-Zellen, die u.a. in Th1-Zellen, Th17-Zellen und regulatorische T-Zellen (Treg) differenzieren. *Has3*-defiziente Tiere zeigen eine verringerte Anzahl dieser Zellen nach I/R sowie eine verminderte Zahl aktivierter T-Zellen. Außerdem geht die Defizienz von *Has3* in den T-Zellen mit einer verminderten Präsenz von HA und CD44 auf der Zelloberfläche einher, da *Has3* die einzig relevant exprimierte Isoform in T-Zellen ist. Die verminderte T-Zell-Reaktion führt schließlich zu einer größeren Narbe, einer schlechteren kardialen Funktion und einer Hypertrophie der verbliebenen Kardiomyozyten.

4.7 Limitierung und Ausblick

Die exakten Mechanismen hinter der veränderten T-Zell-Antwort im Herzen konnten in dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden. Durch den globalen KO von *Has3* lassen sich die Effekte schwer auf einzelne Zelltypen zurückführen. Das wäre jedoch insbesondere bei den T-Zellen und DCs interessant und könnte Aufschluss darüber geben, in welchem Zelltyp *Has3* seine Effekte primär vermittelt. Hierzu wären zelltypspezifische KO Tiere notwendig. So ließe sich mit einem *Has3* KO in CD4⁺ Zellen oder sogar spezifisch in FoxP3⁺ Zellen die genaue Rolle der HAS3 in diesen Zellen und ihr Beitrag zur Heilung nach Infarkt untersuchen. Ebenso wären OTII *Has3* KO Mäuse eine interessante Variante. In diesen könnte die Stimulation der T-Zellen gezielt über eine Zugabe von Ovalbumin und dessen Präsentation durch DC erfolgen. Damit wäre die Rolle von *Has3* produzierter HA in der Interaktion dieser Zellen untersuchbar. Die durchgeführte Stimulation des TCR mit Antikörpern kommt dem zwar relativ nahe, bildet aber nicht die Komponente des Zell-Zell-Kontaktes ab.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Has3* eine potenziell interessante Zielstruktur für die Therapie des Herzinfarktes und ggfs. auch der kardialen Hypertrophie darstellt. Über ihren Einfluss auf T-Zellen könnte *Has3* eine interessante, aber weniger toxische Alternative zu Tacrolimus bilden. Dieses unterbindet spezifisch die Funktion von T-Zellen. Tierexperimente haben einen positiven Effekt auf Infarktgröße und linksventrikuläre Funktion gezeigt.¹⁹⁰ Auch in der Therapie von Autoimmun- und rheumatischen Erkrankungen sind T-Zellen ein bekannter Angriffspunkt. So lassen sich über die Gabe geringer Mengen von IL2 die Tregs stimulieren und somit die Krankheiten therapieren.¹⁹¹ Auch hier könnte eine Modulation von *Has3* langfristig als Alternative dienen.

5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen und vor allem Herzinfarkte sind nach wie vor eine der Haupttodesursachen in Deutschland. Während die medizinische Versorgung im Akutfall durch die Wiedereröffnung des okkludierten Gefäßes sehr gut funktioniert, sind kaum Ansätze zur weiteren Therapie vorhanden. Langzeittherapien, die in das *Remodeling* eingreifen und so die Entstehung einer Herzinsuffizienz vermeiden, sind bislang kaum verfügbar.

Die provisorische EZM, die nach MI gebildet wird, hat einen entscheidenden Einfluss auf die Heilung und das *Remodeling*. In früheren Arbeiten unserer Gruppe konnte die wichtige Rolle der *Has2*-synthetisierten kardialen HA-Matrix beim Makrophagen-Überleben und bei der Fibroblastenaktivierung nach MI gezeigt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Hyaluronsäuresynthase 3 (*Has3*) auf die Heilung nach Herzinfarkt zu untersuchen. Dazu wurden *Has3*-defiziente Tiere einer operativen Ischämie/Reperfusion (I/R) unterzogen und anschließend untersucht. Die *Has3* KO Mäuse zeigten eine verschlechterte Heilung, die sich durch eine reduzierte Herzfunktion, nachteiliges *Remodeling* und kardiale Hypertrophie auszeichnete. Eine detaillierte Analyse der Immunzellen und Fibroblasten zeigte bei den *Has3*-defizienten Tieren, anders als bei *Has2*, keine Veränderungen der Makrophagen- und Fibroblastenpopulationen. Dagegen konnte eine verminderte T-Zell-Antwort beobachtet werden. Im Einzelnen zeigte sich eine Reduktion der Th1- und Treg-Zellen 7 Tage nach I/R. Außerdem war die T-Zell-Aktivierung zu diesem Zeitpunkt reduziert.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit die Bedeutung von HAS3 für die ordnungsgemäße Heilung des Herzens. HAS3 bietet damit ein potenzielles neues Ziel für eine Verbesserung der Heilung und des *remodelings*.

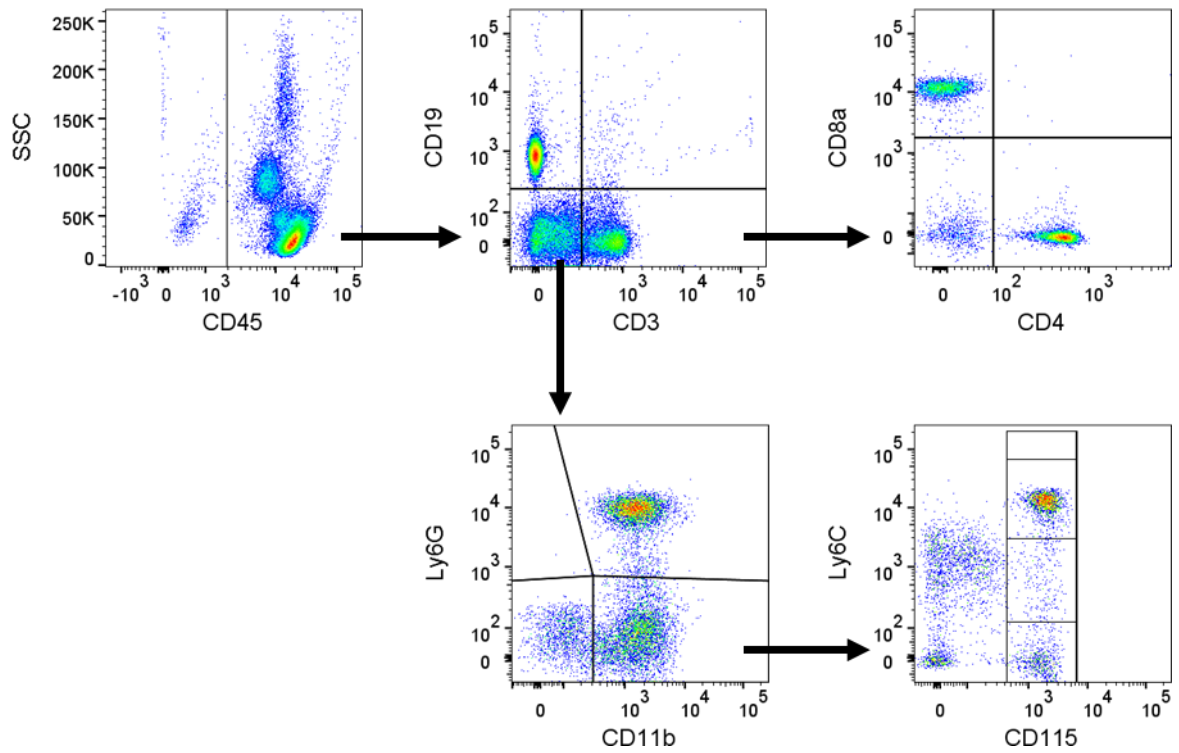
6 Summary

Cardiovascular diseases and specifically myocardial infarction (MI) are the leading cause of death in Germany. While acute treatments including reperfusion therapy are well established, long-term therapies that prevent heart failure by improving myocardial remodeling are limited.

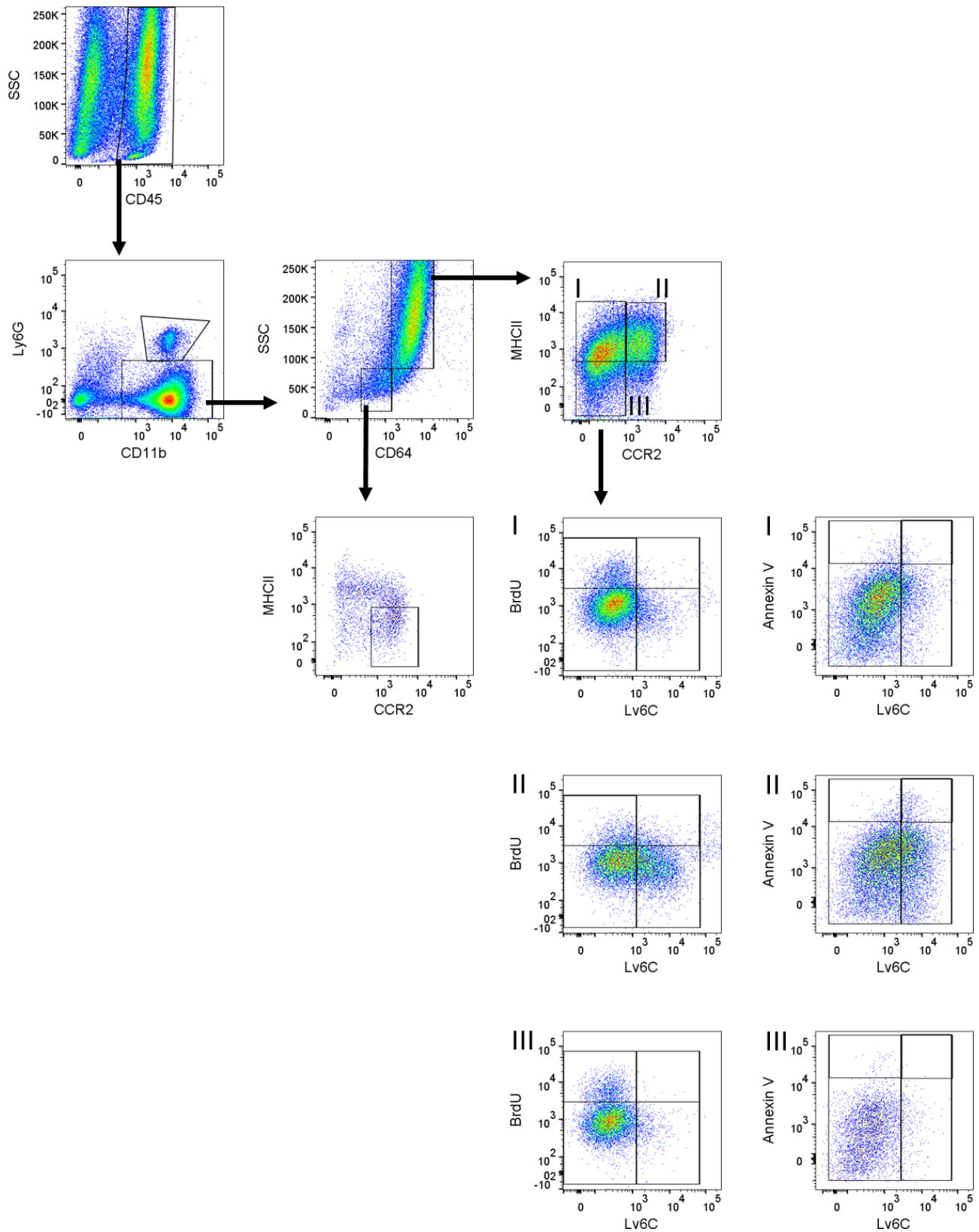
The provisional extracellular matrix, built in the acute phase after MI, is essential for cardiac healing and remodeling. Previous work from our group demonstrated that hyaluronan derived from HAS2 plays an important role in macrophage survival and fibroblast activation after MI. The aim of the present work was to investigate the role of hyaluronan synthase 3 (*Has3*) in healing after MI. Therefore, we evaluated *Has3*-deficient mice subjected to surgical ischemia/reperfusion (I/R). *Has3* deficient mice had impaired healing characterized by reduced cardiac function, adverse remodeling and hypertrophy. A detailed examination of immune cells and fibroblasts demonstrated that in contrast to *Has2*, *Has3*-deficiency did not significantly alter macrophage or fibroblast populations, but rather diminished the T-cell response. In particular, myocardial Th1 and Treg cells were reduced 7 days after I/R. The activation of T-cells was also reduced at this time.

In conclusion, the present work demonstrates the importance of HAS3 for proper cardiac healing. HAS3 thus represents a new therapeutic target to improve cardiac remodeling after MI.

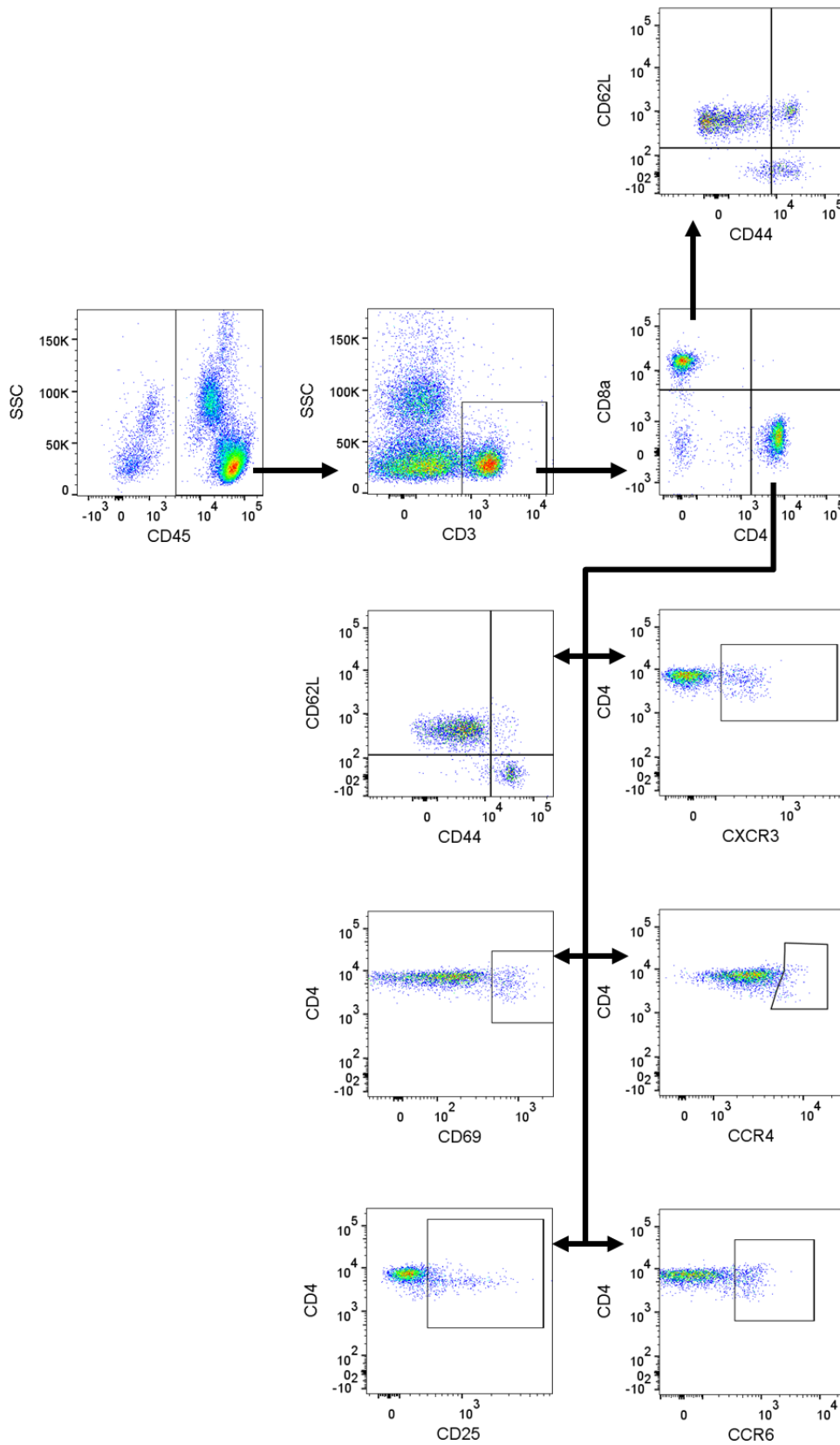
7 Appendix



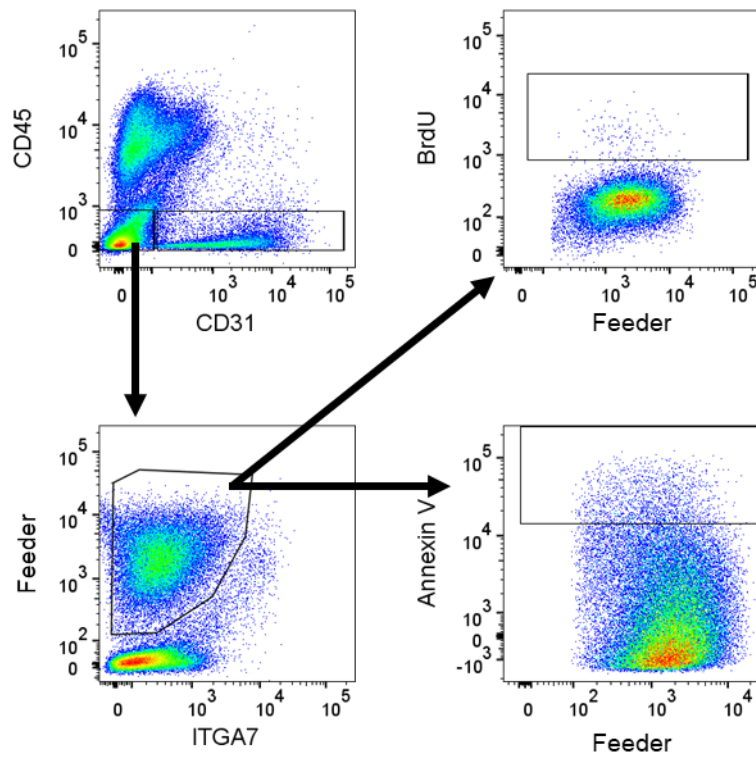
Appendix 1: *Gatingschema* für Immunzellen in Blut und Milz.



Appendix 2: Gatingschema kardialer Monozyten/Makrophagen mit Bestimmung der Proliferation (BrdU) und Apoptose (Annexin V).



Appendix 3: Gatingschema der T-Zell-Subtypen in Herz, Blut, Milz und Lymphknoten mittels Oberflächenmarkern.



Appendix 4: Gatingschema kardialer Fibroblasten.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die zehn häufigsten Ursachen kardiovaskulärer Todesfälle in Deutschland 2019. ²	1
Abbildung 2: Übersicht der wichtigsten CD4 ⁺ T-Zell-Typen.	7
Abbildung 3: chemische Struktur der Hyaluronsäure	10
Abbildung 4: Darstellung der membranständigen Hyaluronsäuresynthasen 1-3 ...	11
Abbildung 5: Darstellung der Generierung <i>Has3</i> -defizienter Mäuse	18
Abbildung 6: mRNA Expression von <i>Has3</i> in Vorhöfen und Blase.....	40
Abbildung 7: Immunhistochemische Bestimmung von HA in Herzgewebe 72 h nach Infarkt.	41
Abbildung 8: Bestimmung der Narbengröße in Gomori gefärbten Herzen 3 Wochen nach Infarkt.	42
Abbildung 9: Narbengrößenbestimmung in Pikrosirius-Rot gefärbten Herzen 3 Wochen nach Infarkt.	43
Abbildung 10: Bestimmung der Kollagendichte in Pikrosirius-Rot gefärbten Herzen 3 Wochen nach Infarkt.	44
Abbildung 11: Zeitverlauf echokardiographisch bestimmter kardialer Funktionsparameter bis zu 3 Wochen nach Infarkt.....	45
Abbildung 12: Ermittlung der Herzmasse mittels Wägung und Echokardiographie. 46	
Abbildung 13: Analyse der mRNA Expression natriuretischer Peptide im <i>remote</i> Myokard 3 Wochen nach Infarkt.....	47
Abbildung 14: Bestimmung der Kardiomyozytengröße in Herzen 3 Wochen nach Infarkt.....	48
Abbildung 15: Immunhistochemische Bestimmung mesenchymaler Zellen in Herzgewebe 72 h nach Infarkt.	49
Abbildung 16: Immunhistochemische Bestimmung der Myofibroblasten in Herzgewebe 72 h nach Infarkt.	50
Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse der Fibroblasten sowie ihrer Apoptose und Proliferation 72 h nach Infarkt.....	51
Abbildung 18: Immunhistochemische Bestimmung der Myofibroblasten in Herzgewebe 7 d nach Infarkt.	52
Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der Fibroblasten sowie ihrer Apoptose und Proliferation 7 d nach Infarkt.....	53
Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse der im Blut zirkulierenden Immunzellen naiver Tiere.....	54
Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse der im Blut zirkulierenden Immunzellen 72 h nach Infarkt.	55

Abbildung 22: Durchflusszytometrische Immunzellanalyse der Milz 72 h nach Infarkt.....	56
Abbildung 23: Immunhistochemische Bestimmung von Makrophagen in Herzgewebe 72 h nach Infarkt.	57
Abbildung 24: Durchflusszytometrische Analyse kardialer Monozyten/Makrophagen 72 h nach Infarkt.	58
Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse des inflammatorischen Status, der Apoptose und der Proliferation kardialer residenter MHCII ^{high} Makrophagen 72 h nach Infarkt.	59
Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse des inflammatorischen Status, der Apoptose und der Proliferation kardialer Monozyten-differenzierter Makrophagen 72 h nach Infarkt.....	60
Abbildung 27: Durchflusszytometrische Analyse des inflammatorischen Status, der Apoptose und der Proliferation kardialer residenter MHCII ^{low} Makrophagen 72 h nach Infarkt.	61
Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse des inflammatorischen Status und der Apoptose kardialer Monozyten 72 h nach Infarkt.	62
Abbildung 29: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten im Blut 72 h nach Infarkt.	64
Abbildung 30: Durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsstatus der zirkulierenden T-Helferzellen 72 h nach Infarkt.	65
Abbildung 31: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten in der Milz 72 h nach Infarkt.	66
Abbildung 32: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten 72 h nach Infarkt.	67
Abbildung 33: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten im Herz 72 h nach Infarkt.	68
Abbildung 34: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten im Herz 7 d nach Infarkt.	69
Abbildung 35: Durchflusszytometrische Analyse der T-Helferzell-Subpopulationen im Herz 7 d nach Infarkt.	70
Abbildung 36: Durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsstatus der zirkulierenden T-Helferzellen 7 d nach Infarkt.	71
Abbildung 37: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten in der Milz 7 d nach Infarkt.	72
Abbildung 38: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten 7 d nach Infarkt.	73
Abbildung 39: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten im Blut 7 d nach Infarkt.....	74
Abbildung 40: Durchflusszytometrische Analyse der T-Helferzell-Subpopulationen im Blut 7 d nach Infarkt.	75

Abbildung 41: Nachweis der Aktivierung in stimulierten T-Zellen.....	76
Abbildung 42: Expressionsanalyse der Hyaluronsäuresynthasen in kultivierten T-Zellen.....	77
Abbildung 43: Expressionsanalyse der HA-Rezeptoren in kultivierten T-Zellen.	78
Abbildung 44: Analyse der Aktivierung von WT- und <i>Has3</i> KO T-Zellen <i>in vitro</i> . ..	79
Abbildung 45: Immunzytochemische Quantifizierung von HA und CD44 in stimulierten T-Zellen.	80
Abbildung 46: Schematische Zusammenfassung der verminderten T-Zell Aktivierung im Herz nach I/R.....	92
Appendix 1: <i>Gatingschema</i> für Immunzellen in Blut und Milz.	96
Appendix 2: <i>Gatingschema</i> kardialer Monozyten/Makrophagen mit Bestimmung der Proliferation (BrdU) und Apoptose (Annexin V).	97
Appendix 3: <i>Gatingschema</i> der T-Zell-Subtypen in Herz, Blut, Milz und Lymphknoten mittels Oberflächenmarkern.....	98
Appendix 4: <i>Gatingschema</i> kardialer Fibroblasten.....	99

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	22
Tabelle 2: Verwendete Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie	23
Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer in der quantitativen <i>realtime</i> -PCR 32	
Tabelle 4: verwendete Taqman Sonden	33
Tabelle 5: Nicht-kommerzielle verwendete Lösungen für histologische Färbungen 35	
Tabelle 6: Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie/Immunzytochemie ..	35

10 Literaturverzeichnis

1. Statistisches_Bundesamt. *Todesursachen - Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10 und nach Geschlecht für 2019*. 2020 30.11.2020 [cited 2021; Available from: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html].
2. Statistisches_Bundesamt. *Todesursachen - Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen*. 2020 30.11.2020 [cited 2021; Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>].
3. Berry, J.D., Dyer, A., Cai, X., Garside, D.B., Ning, H., Thomas, A., Greenland, P., Van Horn, L., Tracy, R.P., and Lloyd-Jones, D.M., *Lifetime risks of cardiovascular disease*. N Engl J Med, 2012. **366**(4): p. 321-9.
4. Lloyd-Jones, D.M., Leip, E.P., Larson, M.G., D'Agostino, R.B., Beiser, A., Wilson, P.W., Wolf, P.A., and Levy, D., *Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age*. Circulation, 2006. **113**(6): p. 791-8.
5. Kannel, W.B., *New perspectives on cardiovascular risk factors*. Am Heart J, 1987. **114**(1 Pt 2): p. 213-9.
6. Kumar, M., Kasala, E.R., Bodduluru, L.N., Dahiya, V., Sharma, D., Kumar, V., and Lahkar, M., *Animal models of myocardial infarction: Mainstay in clinical translation*. Regul Toxicol Pharmacol, 2016. **76**: p. 221-30.
7. Weber, C. and Noels, H., *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1410-22.
8. Tanaka, H., Abe, S., Yamashita, T., Arima, S., Saigo, M., Nakao, S., Toda, H., Nomoto, K., and Tahara, M., *Serum levels of cardiac troponin I and troponin T in estimating myocardial infarct size soon after reperfusion*. Coron Artery Dis, 1997. **8**(7): p. 433-9.
9. Ricchiuti, V., Sharkey, S.W., Murakami, M.M., Voss, E.M., and Apple, F.S., *Cardiac troponin I and T alterations in dog hearts with myocardial infarction: correlation with infarct size*. Am J Clin Pathol, 1998. **110**(2): p. 241-7.
10. Mohammad, M.A., Koul, S., Smith, J.G., Noc, M., Lang, I., Holzer, M., Clemmensen, P., Jensen, U., Engstrom, T., Arheden, H., James, S., Lindahl, B., Metzler, B., and 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. **122**(5): p. 735-743.
11. Adams, J.E., 3rd, Bodor, G.S., Davila-Roman, V.G., Delmez, J.A., Apple, F.S., Ladenson, J.H., and Jaffe, A.S., *Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury*. Circulation, 1993. **88**(1): p. 101-6.
12. Hamm, C.W. and Katus, H.A., *New biochemical markers for myocardial cell injury*. Curr Opin Cardiol, 1995. **10**(4): p. 355-60.

13. Alpert, J.S., *The Fourth Edition of the Universal Definition of Myocardial Infarction*. Am J Med, 2018. **131**(11): p. 1265-1266.
14. Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Chaitman, B.R., Bax, J.J., Morrow, D.A., White, H.D., and Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology /American College of Cardiology /American Heart Association /World Heart Federation Task Force for the Universal Definition of Myocardial, I., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)*. Circulation, 2018. **138**(20): p. e618-e651.
15. Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Simoons, M.L., Chaitman, B.R., White, H.D., Writing Group on the Joint, E.S.C.A.A.H.A.W.H.F.T.F.f.t.U.D.o.M.I., Thygesen, K., Alpert, J.S., White, H.D., Jaffe, A.S., Katus, H.A., Apple, F.S., Lindahl, B., Morrow, D.A., Chaitman, B.A., Clemmensen, P.M., Johanson, P., Hod, H., Underwood, R., Bax, J.J., Bonow, R.O., Pinto, F., Gibbons, R.J., Fox, K.A., Atar, D., Newby, L.K., Galvani, M., Hamm, C.W., Uretsky, B.F., Steg, P.G., Wijns, W., Bassand, J.P., Menasche, P., Ravkilde, J., Ohman, E.M., Antman, E.M., Wallentin, L.C., Armstrong, P.W., Simoons, M.L., Januzzi, J.L., Nieminen, M.S., Gheorghide, M., Filippatos, G., Luepker, R.V., Fortmann, S.P., Rosamond, W.D., Levy, D., Wood, D., Smith, S.C., Hu, D., Lopez-Sendon, J.L., Robertson, R.M., Weaver, D., Tendera, M., Bove, A.A., Parkhomenko, A.N., Vasilieva, E.J., Mendis, S., and Guidelines, E.S.C.C.f.P., *Third universal definition of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2012. **33**(20): p. 2551-67.
16. Moran, A.E., Forouzanfar, M.H., Roth, G.A., Mensah, G.A., Ezzati, M., Flaxman, A., Murray, C.J., and Naghavi, M., *The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: the Global Burden of Disease 2010 study*. Circulation, 2014. **129**(14): p. 1493-501.
17. Ibanez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M.J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., Caforio, A.L.P., Crea, F., Goudevenos, J.A., Halvorsen, S., Hindricks, G., Kastrati, A., Lenzen, M.J., Prescott, E., Roffi, M., Valgimigli, M., Varenhorst, C., Vranckx, P., Widimsky, P., and Group, E.S.C.S.D., *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**(2): p. 119-177.
18. Firth, B.G. and Dunnmon, P.M., *Left ventricular dilatation and failure post-myocardial infarction: pathophysiology and possible pharmacologic interventions*. Cardiovasc Drugs Ther, 1990. **4**(5): p. 1363-74.
19. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair*. Circ Res, 2012. **110**(1): p. 159-73.
20. Remme, W.J., *Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy*. Cardiovasc Drugs Ther, 2003. **17**(4): p. 349-60.
21. Stamboul, K., Zeller, M., Fauchier, L., Gudjoncik, A., Buffet, P., Garnier, F., Guenancia, C., Lorgis, L., Beer, J.C., Touzery, C., and Cottin, Y., *Incidence and prognostic significance of silent atrial fibrillation in acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2014. **174**(3): p. 611-7.

22. Zhang, Y., Elsik, M., Edgley, A.J., Cox, A.J., Kompa, A.R., Wang, B., Tan, C.Y., Khong, F.L., Stapleton, D.I., Zammit, S., Williams, S.J., Gilbert, R.E., Krum, H., and Kelly, D.J., *A new anti-fibrotic drug attenuates cardiac remodeling and systolic dysfunction following experimental myocardial infarction*. *Int J Cardiol*, 2013. **168**(2): p. 1174-85.
23. Jennings, R.B., Murry, C.E., Steenbergen, C., Jr., and Reimer, K.A., *Development of cell injury in sustained acute ischemia*. *Circulation*, 1990. **82**(3 Suppl): p. II2-12.
24. Scarabelli, T., Stephanou, A., Rayment, N., Pasini, E., Comini, L., Curello, S., Ferrari, R., Knight, R., and Latchman, D., *Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury*. *Circulation*, 2001. **104**(3): p. 253-6.
25. Prabhu, S.D. and Frangogiannis, N.G., *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. *Circ Res*, 2016. **119**(1): p. 91-112.
26. Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T., and Roth, J., *S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(1): p. 28-37.
27. de Haan, J.J., Smeets, M.B., Pasterkamp, G., and Arslan, F., *Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction*. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 206039.
28. Sakata, Y., Dong, J.W., Vallejo, J.G., Huang, C.H., Baker, J.S., Tracey, K.J., Tacheuchi, O., Akira, S., and Mann, D.L., *Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **292**(1): p. H503-9.
29. Zhao, P., Wang, J., He, L., Ma, H., Zhang, X., Zhu, X., Dolence, E.K., Ren, J., and Li, J., *Deficiency in TLR4 signal transduction ameliorates cardiac injury and cardiomyocyte contractile dysfunction during ischemia*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(8A): p. 1513-25.
30. Chandrasekar, B., Smith, J.B., and Freeman, G.L., *Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine*. *Circulation*, 2001. **103**(18): p. 2296-302.
31. Maekawa, N., Wada, H., Kanda, T., Niwa, T., Yamada, Y., Saito, K., Fujiwara, H., Sekikawa, K., and Seishima, M., *Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **39**(7): p. 1229-35.
32. Frangogiannis, N.G., *The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling*. *J Clin Invest*, 2017. **127**(5): p. 1600-1612.
33. Koyama, T., Shimada, M., Baba, A., Kosugi, R., and 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**(2): p. 335-7.

34. Sharma, V., Bell, R.M., and Yellon, D.M., *Targeting reperfusion injury in acute myocardial infarction: a review of reperfusion injury pharmacotherapy*. Expert Opin Pharmacother, 2012. **13**(8): p. 1153-75.
35. Nian, M., Lee, P., Khaper, N., and Liu, P., *Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling*. Circ Res, 2004. **94**(12): p. 1543-53.
36. Sellak, H., Franzini, E., Hakim, J., and Pasquier, C., *Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation*. Blood, 1994. **83**(9): p. 2669-77.
37. Shingu, M., Nonaka, S., Nishimukai, H., Nobunaga, M., Kitamura, H., and 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**(1): p. 72-8.
38. Abram, C.L. and Lowell, C.A., *The ins and outs of leukocyte integrin signaling*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 339-62.
39. McEver, R.P., *Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall*. Cardiovasc Res, 2015. **107**(3): p. 331-9.
40. Epelman, S., Liu, P.P., and Mann, D.L., *Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(2): p. 117-29.
41. Mocatta, T.J., Pilbrow, A.P., Cameron, V.A., Senthilmohan, R., Frampton, C.M., Richards, A.M., and Winterbourn, C.C., *Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(20): p. 1993-2000.
42. Monteiro Junior, J.G.M., Torres, D.O.C., da Silva, M., Martins, C.M.H., da Silva, I.K., do Nascimento, M.E.M., Dos Santos, A.C.O., Montarroyos, U.R., and Filho, D.C.S., *Prognostic value of hematological parameters in patients with acute myocardial infarction: Intrahospital outcomes*. PLoS One, 2018. **13**(4): p. 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, F.K., Nahrendorf, M., Buckbinder, L., and Chen, J.W., *Myeloperoxidase Inhibition Improves Ventricular Function and Remodeling After Experimental Myocardial Infarction*. JACC Basic Transl Sci, 2016. **1**(7): p. 633-643.
44. Horckmans, M., Ring, L., Duchene, J., Santovito, D., Schloss, M.J., Drechsler, M., Weber, C., Soehnlein, O., and Steffens, S., *Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype*. Eur Heart J, 2017. **38**(3): p. 187-197.
45. Dutta, P. and Nahrendorf, M., *Monocytes in myocardial infarction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(5): p. 1066-70.
46. Sager, H.B., Heidt, T., Hulsmans, M., Dutta, P., Courties, G., Sebas, M., Wojtkiewicz, G.R., Tricot, B., Iwamoto, Y., Sun, Y., Weissleder, R., Libby, P., Swirski, F.K., and Nahrendorf, M., *Targeting Interleukin-1beta Reduces Leukocyte*

- Production After Acute Myocardial Infarction*. *Circulation*, 2015. **132**(20): p. 1880-90.
47. Sager, H.B., Hulsmans, M., Lavine, K.J., Moreira, M.B., Heidt, T., Courties, G., Sun, Y., Iwamoto, Y., Tricot, B., Khan, O.F., Dahlman, J.E., Borodovsky, A., Fitzgerald, K., Anderson, D.G., Weissleder, R., Libby, P., Swirski, F.K., and Nahrendorf, M., *Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure*. *Circ Res*, 2016. **119**(7): p. 853-64.
48. Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R., *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. *Immunity*, 2003. **19**(1): p. 71-82.
49. Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. *J Exp Med*, 2007. **204**(12): p. 3037-47.
50. Serbina, N.V. and Pamer, E.G., *Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(3): p. 311-7.
51. Dewald, O., Zymek, P., Winkelmann, K., Koerting, A., Ren, G., Abou-Khamis, T., Michael, L.H., Rollins, B.J., Entman, M.L., and Frangogiannis, N.G., *CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts*. *Circ Res*, 2005. **96**(8): p. 881-9.
52. Epelman, S., Lavine, K.J., and Randolph, G.J., *Origin and functions of tissue macrophages*. *Immunity*, 2014. **41**(1): p. 21-35.
53. Liuzzo, G., Trotta, F., and Pedicino, D., *Interleukin-17 in atherosclerosis and cardiovascular disease: the good, the bad, and the unknown*. *Eur Heart J*, 2013. **34**(8): p. 556-9.
54. Ertl, G. and Frantz, S., *Wound model of myocardial infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(3): p. H981-3.
55. Frantz, S., Bauersachs, J., and Ertl, G., *Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation*. *Cardiovasc Res*, 2009. **81**(3): p. 474-81.
56. van der Laan, A.M., Nahrendorf, M., and Piek, J.J., *Healing and adverse remodelling after acute myocardial infarction: role of the cellular immune response*. *Heart*, 2012. **98**(18): p. 1384-90.
57. Yang, Z., Day, Y.J., Toufektsian, M.C., Xu, Y., Ramos, S.I., Marshall, M.A., French, B.A., and Linden, J., *Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes*. *Circulation*, 2006. **114**(19): p. 2056-64.
58. Yan, X., Anzai, A., Katsumata, Y., Matsushashi, T., Ito, K., Endo, J., Yamamoto, T., Takeshima, A., Shinmura, K., Shen, W., Fukuda, K., and Sano, M., *Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction*. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. **62**: p. 24-35.

59. Linfert, D., Chowdhry, T., and Rabb, H., *Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury*. *Transplant Rev (Orlando)*, 2009. **23**(1): p. 1-10.
60. Rossjohn, J., Gras, S., Miles, J.J., Turner, S.J., Godfrey, D.I., and McCluskey, J., *T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules*. *Annu Rev Immunol*, 2015. **33**: p. 169-200.
61. Reynolds, J.M. and Dong, C., *Toll-like receptor regulation of effector T lymphocyte function*. *Trends Immunol*, 2013. **34**(10): p. 511-9.
62. Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., and Carbone, F.R., *Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements*. *Immunol Cell Biol*, 1998. **76**(1): p. 34-40.
63. Hofmann, U., Beyersdorf, N., Weirather, J., Podolskaya, A., Bauersachs, J., Ertl, G., Kerkau, T., and Frantz, S., *Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice*. *Circulation*, 2012. **125**(13): p. 1652-63.
64. Yan, X., Zhang, H., Fan, Q., Hu, J., Tao, R., Chen, Q., Iwakura, Y., Shen, W., Lu, L., Zhang, Q., and Zhang, R., *Dectin-2 Deficiency Modulates Th1 Differentiation and Improves Wound Healing After Myocardial Infarction*. *Circ Res*, 2017. **120**(7): p. 1116-1129.
65. Anzai, A., Anzai, T., Nagai, S., Maekawa, Y., Naito, K., Kaneko, H., Sugano, Y., Takahashi, T., Abe, H., Mochizuki, S., Sano, M., Yoshikawa, T., Okada, Y., Koyasu, S., Ogawa, S., and Fukuda, K., *Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling*. *Circulation*, 2012. **125**(10): p. 1234-45.
66. Dobaczewski, M., Xia, Y., Bujak, M., Gonzalez-Quesada, C., and Frangogiannis, N.G., *CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells*. *Am J Pathol*, 2010. **176**(5): p. 2177-87.
67. Saxena, A., Dobaczewski, M., Rai, V., Haque, Z., Chen, W., Li, N., and Frangogiannis, N.G., *Regulatory T cells are recruited in the infarcted mouse myocardium and may modulate fibroblast phenotype and function*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. **307**(8): p. H1233-42.
68. Tang, T.T., Yuan, J., Zhu, Z.F., Zhang, W.C., Xiao, H., Xia, N., Yan, X.X., Nie, S.F., Liu, J., Zhou, S.F., Li, J.J., Yao, R., Liao, M.Y., Tu, X., Liao, Y.H., and Cheng, X., *Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction*. *Basic Res Cardiol*, 2012. **107**(1): p. 232.
69. Weirather, J., Hofmann, U.D., Beyersdorf, N., Ramos, G.C., Vogel, B., Frey, A., Ertl, G., Kerkau, T., and Frantz, S., *Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation*. *Circ Res*, 2014. **115**(1): p. 55-67.
70. Fu, X., Khalil, H., Kanisicak, O., Boyer, J.G., Vagnozzi, R.J., Maliken, B.D., Sargent, M.A., Prasad, V., Valiente-Alandi, I., Blaxall, B.C., and Molkentin, J.D.,

- Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart.* J Clin Invest, 2018. **128**(5): p. 2127-2143.
71. Woodall, M.C., Woodall, B.P., Gao, E., Yuan, A., and Koch, W.J., *Cardiac Fibroblast GRK2 Deletion Enhances Contractility and Remodeling Following Ischemia/Reperfusion Injury.* Circ Res, 2016. **119**(10): p. 1116-1127.
72. Ma, Y., Iyer, R.P., Jung, M., Czubryt, M.P., and Lindsey, M.L., *Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps.* Trends Pharmacol Sci, 2017. **38**(5): p. 448-458.
73. Ruiz-Villalba, A., Romero, J.P., Hernandez, S.C., Vilas-Zornoza, A., Fortelny, N., Castro-Labrador, L., San Martin-Uriz, P., Lorenzo-Vivas, E., Garcia-Olloqui, P., Palacio, M., Gavira, J.J., Bastarrika, G., Janssens, S., Wu, M., Iglesias, E., Abizanda, G., de Morentin, X.M., Lasaga, M., Planell, N., Bock, C., Alignani, D., Medal, G., Prudovsky, I., Jin, Y.R., Ryzhov, S., Yin, H., Pelacho, B., Gomez-Cabrero, D., Lindner, V., Lara-Astiaso, D., and Prosper, F., *Single-Cell RNA Sequencing Analysis Reveals a Crucial Role for CTHRC1 (Collagen Triple Helix Repeat Containing 1) Cardiac Fibroblasts After Myocardial Infarction.* Circulation, 2020. **142**(19): p. 1831-1847.
74. Clark, D.A. and Coker, R., *Transforming growth factor-beta (TGF-beta).* Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(3): p. 293-8.
75. Dobaczewski, M., Bujak, M., Li, N., Gonzalez-Quesada, C., Mendoza, L.H., Wang, X.F., and Frangogiannis, N.G., *Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction.* Circ Res, 2010. **107**(3): p. 418-28.
76. Kong, P., Christia, P., and Frangogiannis, N.G., *The pathogenesis of cardiac fibrosis.* Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(4): p. 549-74.
77. Del Monte-Nieto, G., Fischer, J.W., Gorski, D.J., Harvey, R.P., and Kovacic, J.C., *Basic Biology of Extracellular Matrix in the Cardiovascular System, Part 1/4: JACC Focus Seminar.* J Am Coll Cardiol, 2020. **75**(17): p. 2169-2188.
78. Itano, N. and Kimata, K., *Mammalian hyaluronan synthases.* IUBMB Life, 2002. **54**(4): p. 195-9.
79. Hascall, V.C., Wang, A., Tammi, M., Oikari, S., Tammi, R., Passi, A., Vigetti, D., Hanson, R.W., and Hart, G.W., *The dynamic metabolism of hyaluronan regulates the cytosolic concentration of UDP-GlcNAc.* Matrix Biol, 2014. **35**: p. 14-7.
80. Weigel, P.H., Hascall, V.C., and Tammi, M., *Hyaluronan synthases.* J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
81. Jiang, D., Liang, J., and Noble, P.W., *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases.* Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 221-64.
82. Hascall, V. and Esko, J.D., *Hyaluronan*, in *Essentials of Glycobiology*, rd, et al., Editors. 2015: Cold Spring Harbor (NY). p. 197-206.
83. Hunger, J., Bernecker, A., Bakker, H.J., Bonn, M., and Richter, R.P., *Hydration dynamics of hyaluronan and dextran.* Biophys J, 2012. **103**(1): p. L10-2.

84. Maytin, E.V., *Hyaluronan: More than just a wrinkle filler*. Glycobiology, 2016. **26**(6): p. 553-9.
85. Fraser, J.R., Laurent, T.C., and Laurent, U.B., *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*. J Intern Med, 1997. **242**(1): p. 27-33.
86. Camenisch, T.D., Spicer, A.P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M.L., Calabro, A., Jr., Kubalak, S., Klewer, S.E., and McDonald, J.A., *Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme*. J Clin Invest, 2000. **106**(3): p. 349-60.
87. Termeer, C., Sleeman, J.P., and Simon, J.C., *Hyaluronan--magic glue for the regulation of the immune response?* Trends Immunol, 2003. **24**(3): p. 112-4.
88. Weigel, P.H. and DeAngelis, P.L., *Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases*. J Biol Chem, 2007. **282**(51): p. 36777-81.
89. Spicer, A.P., Seldin, M.F., Olsen, A.S., Brown, N., Wells, D.E., Doggett, N.A., Itano, N., Kimata, K., Inazawa, J., and McDonald, J.A., *Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes*. Genomics, 1997. **41**(3): p. 493-7.
90. Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, A.P., McDonald, J.A., and Kimata, K., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 25085-92.
91. Spicer, A.P. and Tien, J.Y., *Hyaluronan and morphogenesis*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2004. **72**(1): p. 89-108.
92. Homann, S., Grandoch, M., Kiene, L.S., Podsvyadek, Y., Feldmann, K., Rabausch, B., Nagy, N., Lehr, S., Kretschmer, I., Oberhuber, A., Bollyky, P., and Fischer, J.W., *Hyaluronan synthase 3 promotes plaque inflammation and atheroprogession*. Matrix Biol, 2018. **66**: p. 67-80.
93. Tammi, R.H., Passi, A.G., Rilla, K., Karousou, E., Vigetti, D., Makkonen, K., and Tammi, M.I., *Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis*. FEBS J, 2011. **278**(9): p. 1419-28.
94. Kuipers, H.F., Nagy, N., Ruppert, S.M., Sunkari, V.G., Marshall, P.L., Gebe, J.A., Ishak, H.D., Keswani, S.G., Bollyky, J., Frymoyer, A.R., Wight, T.N., Steinman, L., and Bollyky, P.L., *The pharmacokinetics and dosing of oral 4-methylumbelliferone for inhibition of hyaluronan synthesis in mice*. Clin Exp Immunol, 2016. **185**(3): p. 372-81.
95. Kultti, A., Pasonen-Seppanen, S., Jauhiainen, M., Rilla, K.J., Karna, R., Pyoria, E., Tammi, R.H., and Tammi, M.I., *4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3*. Exp Cell Res, 2009. **315**(11): p. 1914-23.
96. Kuipers, H.F., Rieck, M., Gurevich, I., Nagy, N., Butte, M.J., Negrin, R.S., Wight, T.N., Steinman, L., and Bollyky, P.L., *Hyaluronan synthesis is necessary for*

- autoreactive T-cell trafficking, activation, and Th1 polarization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(5): p. 1339-44.
97. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., and Seed, B., *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate*. Cell, 1990. **61**(7): p. 1303-13.
98. Yang, B., Zhang, L., and Turley, E.A., *Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM*. J Biol Chem, 1993. **268**(12): p. 8617-23.
99. Zhou, B., Weigel, J.A., Fauss, L., and Weigel, P.H., *Identification of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE)*. J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37733-41.
100. Banerji, S., Ni, J., Wang, S.X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., Jones, M., and Jackson, D.G., *LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan*. J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 789-801.
101. Jiang, D., Liang, J., Fan, J., Yu, S., Chen, S., Luo, Y., Prestwich, G.D., Mascarenhas, M.M., Garg, H.G., Quinn, D.A., Homer, R.J., Goldstein, D.R., Bucala, R., Lee, P.J., Medzhitov, R., and Noble, P.W., *Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1173-9.
102. Sohr, S. and Engeland, K., *RHAMM is differentially expressed in the cell cycle and downregulated by the tumor suppressor p53*. Cell Cycle, 2008. **7**(21): p. 3448-60.
103. Misra, S., Hascall, V.C., Markwald, R.R., and Ghatak, S., *Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 201.
104. Senbanjo, L.T. and Chellaiah, M.A., *CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells*. Front Cell Dev Biol, 2017. **5**: p. 18.
105. Zhang, G., Zhang, H., Liu, Y., He, Y., Wang, W., Du, Y., Yang, C., and Gao, F., *CD44 clustering is involved in monocyte differentiation*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014. **46**(7): p. 540-7.
106. Sckisel, G.D., Mirsoian, A., Minnar, C.M., Crittenden, M., Curti, B., Chen, J.Q., Blazar, B.R., Borowsky, A.D., Monjazeb, A.M., and Murphy, W.J., *Differential phenotypes of memory CD4 and CD8 T cells in the spleen and peripheral tissues following immunostimulatory therapy*. J Immunother Cancer, 2017. **5**: p. 33.
107. Bollyky, P.L., Evanko, S.P., Wu, R.P., Potter-Perigo, S., Long, S.A., Kinsella, B., Reijonen, H., Guebner, K., Teng, B., Chan, C.K., Braun, K.R., Gebe, J.A., Nepom, G.T., and Wight, T.N., *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**(3): p. 211-20.
108. Hegde, V.L., Singh, N.P., Nagarkatti, P.S., and Nagarkatti, M., *CD44 mobilization in allogeneic dendritic cell-T cell immunological synapse plays a key role in T cell activation*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(1): p. 134-42.

109. Iozzo, R.V. and Schaefer, L., *Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans*. Matrix Biol, 2015. **42**: p. 11-55.
110. Milev, P., Maurel, P., Chiba, A., Mevissen, M., Popp, S., Yamaguchi, Y., Margolis, R.K., and Margolis, R.U., *Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(2): p. 207-12.
111. Wight, T.N., Kinsella, M.G., Evanko, S.P., Potter-Perigo, S., and Merrilees, M.J., *Versican and the regulation of cell phenotype in disease*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(8): p. 2441-51.
112. Kawashima, H., Hirose, M., Hirose, J., Nagakubo, D., Plaas, A.H., and Miyasaka, M., *Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan, versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35448-56.
113. Kawashima, H., Atarashi, K., Hirose, M., Hirose, J., Yamada, S., Sugahara, K., and Miyasaka, M., *Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcA β 1/IdoA α 1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines*. J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 12921-30.
114. Wight, T.N., *Arterial remodeling in vascular disease: a key role for hyaluronan and versican*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 4933-7.
115. Csoka, A.B., Frost, G.I., and Stern, R., *The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes*. Matrix Biol, 2001. **20**(8): p. 499-508.
116. Bourguignon, V. and Flamion, B., *Respective roles of hyaluronidases 1 and 2 in endogenous hyaluronan turnover*. FASEB J, 2016. **30**(6): p. 2108-14.
117. Lepperdinger, G., Mullegger, J., and Kreil, G., *Hyal2--less active, but more versatile?* Matrix Biol, 2001. **20**(8): p. 509-14.
118. Chowdhury, B., Hemming, R., Hombach-Klonisch, S., Flamion, B., and Triggs-Raine, B., *Murine hyaluronidase 2 deficiency results in extracellular hyaluronan accumulation and severe cardiopulmonary dysfunction*. J Biol Chem, 2013. **288**(1): p. 520-8.
119. Hofinger, E.S., Hoehstetter, J., Oetl, M., Bernhardt, G., and Buschauer, A., *Isoenzyme-specific differences in the degradation of hyaluronic acid by mammalian-type hyaluronidases*. Glycoconj J, 2008. **25**(2): p. 101-9.
120. Tammi, M.I., Oikari, S., Pasonen-Seppanen, S., Rilla, K., Auvinen, P., and Tammi, R.H., *Activated hyaluronan metabolism in the tumor matrix - Causes and consequences*. Matrix Biol, 2019. **78-79**: p. 147-164.
121. Yoshida, H., Nagaoka, A., Nakamura, S., Sugiyama, Y., Okada, Y., and Inoue, S., *Murine homologue of the human KIAA1199 is implicated in hyaluronan binding and depolymerization*. FEBS Open Bio, 2013. **3**: p. 352-6.
122. Dahl, L.B., Dahl, I.M., Engstrom-Laurent, A., and 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**(12): p. 817-22.
123. de la Motte, C.A., Hascall, V.C., Drazba, J., Bandyopadhyay, S.K., and Strong, S.A., *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**(1): p. 121-33.
124. Gebe, J.A., Gooden, M.D., Workman, G., Nagy, N., Bollyky, P.L., Wight, T.N., and Vernon, R.B., *Modulation of hyaluronan synthases and involvement of T cell-derived hyaluronan in autoimmune responses to transplanted islets*. Matrix Biol Plus, 2021. **9**: p. 100052.
125. DeGrendele, H.C., Estess, P., Picker, L.J., and Siegelman, M.H., *CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1119-30.
126. Hellman, U., Hellstrom, M., Morner, S., Engstrom-Laurent, A., Aberg, A.M., Oliviero, P., Samuel, J.L., and Waldenstrom, A., *Parallel up-regulation of FGF-2 and hyaluronan during development of cardiac hypertrophy in rat*. Cell Tissue Res, 2008. **332**(1): p. 49-56.
127. Huebener, P., Abou-Khamis, T., Zymek, P., Bujak, M., Ying, X., Chatila, K., Haudek, S., Thakker, G., and Frangogiannis, N.G., *CD44 is critically involved in infarct healing by regulating the inflammatory and fibrotic response*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2625-33.
128. Waldenstrom, A., Martinussen, H.J., Gerdin, B., and Hallgren, R., *Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction*. J Clin Invest, 1991. **88**(5): p. 1622-8.
129. Dobaczewski, M., Bujak, M., Zymek, P., Ren, G., Entman, M.L., and Frangogiannis, N.G., *Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts*. Cell Tissue Res, 2006. **324**(3): p. 475-88.
130. Yoon, S.J., Fang, Y.H., Lim, C.H., Kim, B.S., Son, H.S., Park, Y., and Sun, K., *Regeneration of ischemic heart using hyaluronic acid-based injectable hydrogel*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009. **91**(1): p. 163-71.
131. Abdalla, S., Makhoul, G., Duong, M., Chiu, R.C., and 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**(5): p. 767-72.
132. Dorsey, S.M., McGarvey, J.R., Wang, H., Nikou, A., Arama, L., Koomalsingh, K.J., Kondo, N., Gorman, J.H., 3rd, Pilla, J.J., Gorman, R.C., Wenk, J.F., and Burdick, J.A., *MRI evaluation of injectable hyaluronic acid-based hydrogel therapy to limit ventricular remodeling after myocardial infarction*. Biomaterials, 2015. **69**: p. 65-75.
133. Muller, J., Gorressen, S., Grandoch, M., Feldmann, K., Kretschmer, I., Lehr, S., Ding, Z., Schmitt, J.P., Schrader, J., Garbers, C., Heusch, G., Kelm, M., Scheller, J., and Fischer, J.W., *Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac*

- fibroblasts after acute myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 2014. **109**(6): p. 440.
134. Petz, A., Grandoch, M., Gorski, D.J., Abrams, M., Piroth, M., Schneckmann, R., Homann, S., Muller, J., Hartwig, S., Lehr, S., Yamaguchi, Y., Wight, T.N., Gorressen, S., Ding, Z., Kotter, S., Kruger, M., Heinen, A., Kelm, M., Godecke, A., Fogel, U., and Fischer, J.W., *Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury*. Circ Res, 2019. **124**(10): p. 1433-1447.
135. Kiene, L.S., Homann, S., Suvorava, T., Rabausch, B., Muller, J., Kojda, G., Kretschmer, I., Twarock, S., Dai, G., Deenen, R., Hartwig, S., Lehr, S., Kohrer, K., Savani, R.C., Grandoch, M., and Fischer, J.W., *Deletion of Hyaluronan Synthase 3 Inhibits Neointimal Hyperplasia in Mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. **36**(2): p. e9-16.
136. Merx, M.W., Gorressen, S., van de Sandt, A.M., Cortese-Krott, M.M., Ohlig, J., Stern, M., Rassaf, T., Godecke, A., Gladwin, M.T., and Kelm, M., *Depletion of circulating blood NOS3 increases severity of myocardial infarction and left ventricular dysfunction*. Basic Res Cardiol, 2014. **109**(1): p. 398.
137. Gorressen, S., Stern, M., van de Sandt, A.M., Cortese-Krott, M.M., Ohlig, J., Rassaf, T., Godecke, A., Fischer, J.W., Heusch, G., Merx, M.W., and Kelm, M., *Circulating NOS3 modulates left ventricular remodeling following reperfused myocardial infarction*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0120961.
138. Krusche, C.A., Holthofer, B., Hofe, V., van de Sandt, A.M., Eshkind, L., Bockamp, E., Merx, M.W., Kant, S., Windoffer, R., and Leube, R.E., *Desmoglein 2 mutant mice develop cardiac fibrosis and dilation*. Basic Res Cardiol, 2011. **106**(4): p. 617-33.
139. Van den Broeck, W., Derore, A., and Simoens, P., *Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice*. J Immunol Methods, 2006. **312**(1-2): p. 12-9.
140. Dick, S.A., Macklin, J.A., Nejat, S., Momen, A., Clemente-Casares, X., Althagafi, M.G., Chen, J., Kantores, C., Hosseinzadeh, S., Aronoff, L., Wong, A., Zaman, R., Barbu, I., Besla, R., Lavine, K.J., Razani, B., Ginhoux, F., Husain, M., Cybulsky, M.I., Robbins, C.S., and Epelman, S., *Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction*. Nat Immunol, 2019. **20**(1): p. 29-39.
141. Yue, F., Cheng, Y., Breschi, A., Vierstra, J., Wu, W., Ryba, T., Sandstrom, R., Ma, Z., Davis, C., Pope, B.D., Shen, Y., Pervouchine, D.D., Djebali, S., Thurman, R.E., Kaul, R., Rynes, E., Kirilusha, A., Marinov, G.K., Williams, B.A., Trout, D., Amrhein, H., Fisher-Aylor, K., Antoshechkin, I., DeSalvo, G., See, L.H., Fastuca, M., Drenkow, J., Zaleski, C., Dobin, A., Prieto, P., Lagarde, J., Bussotti, G., Tanzer, A., Denas, O., Li, K., Bender, M.A., Zhang, M., Byron, R., Groudine, M.T., McCleary, D., Pham, L., Ye, Z., Kuan, S., Edsall, L., Wu, Y.C., Rasmussen, M.D., Bansal, M.S., Kellis, M., Keller, C.A., Morrissey, C.S., Mishra, T., Jain, D., Dogan, N., Harris, R.S., Cayting, P., Kawli, T., Boyle, A.P., Euskirchen, G., Kundaje, A., Lin, S., Lin, Y., Jansen, C., Malladi, V.S., Cline, M.S., Erickson, D.T., Kirkup, V.M., Learned, K., Sloan, C.A., Rosenbloom, K.R., Lacerda de Sousa, B., Beal, K.,

- Pignatelli, M., Flicek, P., Lian, J., Kahveci, T., Lee, D., Kent, W.J., Ramalho Santos, M., Herrero, J., Notredame, C., Johnson, A., Vong, S., Lee, K., Bates, D., Neri, F., Diegel, M., Canfield, T., Sabo, P.J., Wilken, M.S., Reh, T.A., Giste, E., Shafer, A., Kutuyavin, T., Haugen, E., Dunn, D., Reynolds, A.P., Neph, S., Humbert, R., Hansen, R.S., De Bruijn, M., Selleri, L., Rudensky, A., Josefowicz, S., Samstein, R., Eichler, E.E., Orkin, S.H., Levasseur, D., Papayannopoulou, T., Chang, K.H., Skoultchi, A., Gosh, S., Disteché, C., Treuting, P., Wang, Y., Weiss, M.J., Blobel, G.A., Cao, X., Zhong, S., Wang, T., Good, P.J., Lowdon, R.F., Adams, L.B., Zhou, X.Q., Pazin, M.J., Feingold, E.A., Wold, B., Taylor, J., Mortazavi, A., Weissman, S.M., Stamatoyannopoulos, J.A., Snyder, M.P., Guigo, R., Gingeras, T.R., Gilbert, D.M., Hardison, R.C., Beer, M.A., Ren, B. and Mouse, E.C., *A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome*. Nature, 2014. **515**(7527): p. 355-64.
142. Hill, J.A. and Olson, E.N., *Cardiac plasticity*. N Engl J Med, 2008. **358**(13): p. 1370-80.
143. Knowles, J.W., Esposito, G., Mao, L., Hagan, J.R., Fox, J.E., Smithies, O., Rockman, H.A., and Maeda, N., *Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice*. J Clin Invest, 2001. **107**(8): p. 975-84.
144. Everaert, B.R., Boulet, G.A., Timmermans, J.P., and Vrints, C.J., *Importance of suitable reference gene selection for quantitative real-time PCR: special reference to mouse myocardial infarction studies*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23793.
145. Bradshaw, A.D. and DeLeon-Pennell, K.Y., *T-cell regulation of fibroblasts and cardiac fibrosis*. Matrix Biol, 2020. **91-92**: p. 167-175.
146. Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T.R., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J., *Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites*. Science, 2009. **325**(5940): p. 612-6.
147. Chien, Y.H. and Hampl, J., *Antigen-recognition properties of murine gamma delta T cells*. Springer Semin Immunopathol, 2000. **22**(3): p. 239-50.
148. Banczyk, D., Kalies, K., Nachbar, L., Bergmann, L., Schmidt, P., Bode, U., Teegen, B., Steven, P., Lange, T., Textor, J., Ludwig, R.J., Stocker, W., König, P., Bell, E., and Westermann, J., *Activated CD4+ T cells enter the splenic T-cell zone and induce autoantibody-producing germinal centers through bystander activation*. Eur J Immunol, 2014. **44**(1): p. 93-102.
149. Rieckmann, M., Delgobo, M., Gaal, C., Buchner, L., Steinau, P., Reshef, D., Gil-Cruz, C., Horst, E.N.T., Kircher, M., Reiter, T., Heinze, K.G., Niessen, H.W., Krijnen, P.A., van der Laan, A.M., Piek, J.J., Koch, C., Wester, H.J., Lapa, C., Bauer, W.R., Ludewig, B., Friedman, N., Frantz, S., Hofmann, U., and Ramos, G.C., *Myocardial infarction triggers cardioprotective antigen-specific T helper cell responses*. J Clin Invest, 2019. **129**(11): p. 4922-4936.
150. Fowler, N.O., Jr., *Splenomegaly in congestive heart failure*. Ann Intern Med, 1947. **27**(5): p. 733-7.

151. Hofmann, U. and Frantz, S., *Role of T-cells in myocardial infarction*. Eur Heart J, 2016. **37**(11): p. 873-9.
152. Blanton, R.M., Carrillo-Salinas, F.J., and Alcaide, P., *T-cell recruitment to the heart: friendly guests or unwelcome visitors?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019. **317**(1): p. H124-H140.
153. Santos-Zas, I., Lemarie, J., Tedgui, A., and Ait-Oufella, H., *Adaptive Immune Responses Contribute to Post-ischemic Cardiac Remodeling*. Front Cardiovasc Med, 2018. **5**: p. 198.
154. Kalies, K., Konig, P., Zhang, Y.M., Deierling, M., Barthelmann, J., Stamm, C., and Westermann, J., *Nonoverlapping expression of IL10, IL12p40, and IFNgamma mRNA in the marginal zone and T cell zone of the spleen after antigenic stimulation*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5457-65.
155. Mummert, M.E., Mummert, D., Edelbaum, D., Hui, F., Matsue, H., and Takashima, A., *Synthesis and surface expression of hyaluronan by dendritic cells and its potential role in antigen presentation*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4322-31.
156. Fan, D., Takawale, A., Lee, J., and Kassiri, Z., *Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. **5**(1): p. 15.
157. Eghbali, M., *Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation*. Basic Res Cardiol, 1992. **87 Suppl 2**: p. 183-9.
158. Nossuli, T.O., Lakshminarayanan, V., Baumgarten, G., Taffet, G.E., Ballantyne, C.M., Michael, L.H., and Entman, M.L., *A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(4): p. H1049-55.
159. Axelsson, J., Wieslander, B., Jablonowski, R., Klem, I., Nijveldt, R., Schelbert, E.B., Sorensson, P., Sigfridsson, A., Chaudhry, U., Platonov, P.G., Borgquist, R., Engblom, H., Strauss, D.G., Arheden, H., Atwater, B.D., and Ugander, M., *Ejection fraction in left bundle branch block is disproportionately reduced in relation to amount of myocardial scar*. J Electrocardiol, 2018. **51**(6): p. 1071-1076.
160. Montes, G.S. and Junqueira, L.C., *The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1991. **86 Suppl 3**: p. 1-11.
161. Westermann, D., Mersmann, J., Melchior, A., Freudenberger, T., Petrik, C., Schaefer, L., Lullmann-Rauch, R., Lettau, O., Jacoby, C., Schrader, J., Brand-Herrmann, S.M., Young, M.F., Schultheiss, H.P., Levkau, B., Baba, H.A., Unger, T., Zacharowski, K., Tschope, C., and Fischer, J.W., *Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction*. Circulation, 2008. **117**(10): p. 1269-76.
162. Henri, O., Pouehe, C., Houssari, M., Galas, L., Nicol, L., Edwards-Levy, F., Henry, J.P., Dumesnil, A., Boukhalifa, I., Banquet, S., Schapman, D., Thuillez, C., Richard, V., Mulder, P., and Brakenhielm, E., *Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to*

- Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction*. *Circulation*, 2016. **133**(15): p. 1484-97; discussion 1497.
163. Gardner, D.G., *Natriuretic peptides: markers or modulators of cardiac hypertrophy?* *Trends Endocrinol Metab*, 2003. **14**(9): p. 411-6.
164. Kung, Y.L., Lu, C.Y., Badrealam, K.F., Kuo, W.W., Shibu, M.A., Day, C.H., Chen, R.J., Lu, S.Y., Padma, V.V., and Huang, C.Y., *Cardioprotective potential of amygdalin against angiotensin II induced cardiac hypertrophy, oxidative stress and inflammatory responses through modulation of Nrf2 and NF-kappaB activation*. *Environ Toxicol*, 2021. **36**(5): p. 926-934.
165. Nakagawa, Y., Nishikimi, T., and Kuwahara, K., *Atrial and brain natriuretic peptides: Hormones secreted from the heart*. *Peptides*, 2019. **111**: p. 18-25.
166. Nicolas, D., Kerndt, C.C., and Reed, M., *Sacubitril/Valsartan*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
167. Teekakirikul, P., Eminaga, S., Toka, O., Alcalai, R., Wang, L., Wakimoto, H., Naylor, M., Konno, T., Gorham, J.M., Wolf, C.M., Kim, J.B., Schmitt, J.P., Molkentin, J.D., Norris, R.A., Tager, A.M., Hoffman, S.R., Markwald, R.R., Seidman, C.E., and Seidman, J.G., *Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf-beta*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(10): p. 3520-9.
168. Evanko, S.P., Potter-Perigo, S., Bollyky, P.L., Nepom, G.T., and Wight, T.N., *Hyaluronan and versican in the control of human T-lymphocyte adhesion and migration*. *Matrix Biol*, 2012. **31**(2): p. 90-100.
169. Marshall, P.L., Nagy, N., Kaber, G., Barlow, G.L., Ramesh, A., Xie, B.J., Linde, M.H., Haddock, N.L., Lester, C.A., Tran, Q.L., de Vries, C.R., Hargil, A., Malkovskiy, A.V., Gurevich, I., Martinez, H.A., Kuipers, H.F., Yadava, K., Zhang, X., Evanko, S.P., Gebe, J.A., Wang, X., Vernon, R.B., de la Motte, C., Wight, T.N., Engleman, E.G., Krams, S.M., Meyer, E.H., and Bollyky, P.L., *Hyaluronan synthesis inhibition impairs antigen presentation and delays transplantation rejection*. *Matrix Biol*, 2021. **96**: p. 69-86.
170. Grandoch, M., Bollyky, P.L., and Fischer, J.W., *Hyaluronan: A Master Switch Between Vascular Homeostasis and Inflammation*. *Circ Res*, 2018. **122**(10): p. 1341-1343.
171. Litwiniuk, M., Krejner, A., Speyrer, M.S., Gauto, A.R., and Grzela, T., *Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration*. *Wounds*, 2016. **28**(3): p. 78-88.
172. Petrey, A.C. and de la Motte, C.A., *Hyaluronan in inflammatory bowel disease: Cross-linking inflammation and coagulation*. *Matrix Biol*, 2019. **78-79**: p. 314-323.
173. Nemzek, J.A., Bolgos, G.L., Williams, B.A., and Remick, D.G., *Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site*. *Inflamm Res*, 2001. **50**(10): p. 523-7.
174. Leuschner, F., Panizzi, P., Chico-Calero, I., Lee, W.W., Ueno, T., Cortez-Retamozo, V., Waterman, P., Gorbatov, R., Marinelli, B., Iwamoto, Y., Chudnovskiy, A., Figueiredo, J.L., Sosnovik, D.E., Pittet, M.J., Swirski, F.K.,

- Weissleder, R., and Nahrendorf, M., *Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction*. *Circ Res*, 2010. **107**(11): p. 1364-73.
175. Klopffleisch, R., *Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model - Phenotypes, functions and markers*. *Acta Biomater*, 2016. **43**: p. 3-13.
176. Weinberger, T. and Schulz, C., *Myocardial infarction: a critical role of macrophages in cardiac remodeling*. *Front Physiol*, 2015. **6**: p. 107.
177. Kaikita, K., Hayasaki, T., Okuma, T., Kuziel, W.A., Ogawa, H., and Takeya, M., *Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(2): p. 439-47.
178. Bogdan, C. and Schleicher, U., *Production of interferon-gamma by myeloid cells--fact or fancy?* *Trends Immunol*, 2006. **27**(6): p. 282-90.
179. Rincon, M., *Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(11): p. 571-7.
180. Fischer, J.W., *Role of hyaluronan in atherosclerosis: Current knowledge and open questions*. *Matrix Biol*, 2019. **78-79**: p. 324-336.
181. Bollyky, P.L., Falk, B.A., Wu, R.P., Buckner, J.H., Wight, T.N., and Nepom, G.T., *Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: high molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4+CD25+ regulatory T cells*. *J Leukoc Biol*, 2009. **86**(3): p. 567-72.
182. Bollyky, P.L., Lord, J.D., Masewicz, S.A., Evanko, S.P., Buckner, J.H., Wight, T.N., and Nepom, G.T., *Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2007. **179**(2): p. 744-7.
183. Mahaffey, C.L. and Mummert, M.E., *Hyaluronan synthesis is required for IL-2-mediated T cell proliferation*. *J Immunol*, 2007. **179**(12): p. 8191-9.
184. Mathes, D., Weirather, J., Nordbeck, P., Arias-Loza, A.P., Burkard, M., Pachel, C., Kerkau, T., Beyersdorf, N., Frantz, S., and Hofmann, U., *CD4(+) Foxp3(+) T-cells contribute to myocardial ischemia-reperfusion injury*. *J Mol Cell Cardiol*, 2016. **101**: p. 99-105.
185. Zacchigna, S., Martinelli, V., Moimas, S., Colliva, A., Anzini, M., Nordio, A., Costa, A., Rehman, M., Vodret, S., Pierro, C., Colussi, G., Zentilin, L., Gutierrez, M.I., Dirx, E., Long, C., Sinagra, G., Klatzmann, D., and Giacca, M., *Paracrine effect of regulatory T cells promotes cardiomyocyte proliferation during pregnancy and after myocardial infarction*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 2432.
186. Fischer, K., Voelkl, S., Heymann, J., Przybylski, G.K., Mondal, K., Laumer, M., Kunz-Schughart, L., Schmidt, C.A., Andreesen, R., and Mackensen, A., *Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8-double-negative regulatory T cells*. *Blood*, 2005. **105**(7): p. 2828-35.

187. Savinov, A.Y., Rozanov, D.V., and Strongin, A.Y., *Mechanistic insights into targeting T cell membrane proteinase to promote islet beta-cell rejuvenation in type 1 diabetes*. FASEB J, 2006. **20**(11): p. 1793-801.
188. Sojka, D.K., Bruniquel, D., Schwartz, R.H., and Singh, N.J., *IL-2 secretion by CD4+ T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6136-43.
189. Schumann, J., Stanko, K., Schliesser, U., Appelt, C., and Sawitzki, B., *Differences in CD44 Surface Expression Levels and Function Discriminates IL-17 and IFN-gamma Producing Helper T Cells*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132479.
190. Ko, S.F., Yip, H.K., Leu, S., Lee, C.C., Sheu, J.J., Lee, C.C., Ng, S.H., Huang, C.C., Chen, M.C., and Sun, C.K., *Therapeutic potential of tacrolimus on acute myocardial infarction in minipigs: analysis with serial cardiac magnetic resonance and changes at histological and protein levels*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 524078.
191. Grasshoff, H., Comduhr, S., Monne, L.R., Muller, A., Lamprecht, P., Riemekasten, G., and Humrich, J.Y., *Low-Dose IL-2 Therapy in Autoimmune and Rheumatic Diseases*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 648408.

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.

12 Posterpräsentationen

Marco Piroth, Daniel Gorski, Anne Petz, Simone Gorressen, Maria Grandoch, Jens W. Fischer

Hyaluronan synthase 3 deficiency results in adverse remodeling and reduced macrophage and fibroblast abundance after acute cardiac ischemia

86. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 2020, Leipzig

Marco Piroth, Daniel Gorski, Anne Petz, Christian Hundhausen, Simone Gorressen, Jens W. Fischer

Hyaluronan synthase 3 deficiency results in adverse remodeling and decreased cardiac CD4-T-cell abundance after acute ischemia.

Cardiovascular Disease Symposium, 2021, Düsseldorf

Marco Piroth, Daniel Gorski, Anne Petz, Christian Hundhausen, Simone Gorressen, Jens W. Fischer

Hyaluronan synthase 3 deficiency results in adverse remodeling and decreased cardiac CD4-T-cell abundance after acute ischemia.

International Society For Hyaluronan Science – 13th International Conference, 2021, virtual meeting

13 Lebenslauf

Person

Name	Marco André Piroth
Geburtsdatum	20.04.1992
Geburtsort	Aachen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Promotion

07/2017 - 03/2022	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf Doktorvater: Professor Dr. Jens W. Fischer Thema: „Rolle der Hyaluronsäuresynthase 3 für die Heilung nach kardialer Ischämie/Reperfusion“
-------------------	---

Studium

06/2017	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Erteilung der Approbation als Apotheker
11/2016-04/2017	Pharmaziepraktikum, Madaus GmbH, Troisdorf
05/2016-10/2016	Pharmaziepraktikum, Jahreszeiten-Apotheke, Münster
04/2016	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
04/2014	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
04/2012-04/2016	Studium der Pharmazie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster

Schule

09/2002- 07/2011	Bischöfliches Pius-Gymnasium, Aachen
09/1998 -08/2002	Gemeindeschule, Eynatten, Belgien

14 Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Jens W. Fischer für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung durchführen zu können. Er fand zur richtigen Zeit die richtigen Worte, um diese Arbeit schlussendlich zum Erfolg zu führen. Durch die Möglichkeiten der Beschäftigung im SFB1116 konnte ich dabei auch abseits der Projektarbeit spannende wissenschaftliche Einblicke gewinnen. Mein zweiter riesengroßer Dank gilt Dr. Daniel Gorski, der von Anfang an meine unmittelbare Betreuung übernommen hat und dabei stets die Balance zwischen Führung und Freiheit gefunden hat. Seine fachliche Anleitung im Labor, aber vor allem auch sein Weitblick in der Projektplanung haben diese Arbeit erst ermöglicht. Vielen Dank für die Hilfe und das stets offene Ohr – sowohl fachlich als auch in den kleineren und größeren persönlichen Krisen. Bei Herrn Professor Dr. Axel Gödecke möchte ich mich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken. Mein nächster großer Dank gilt den Kollegen, die mich stets mit Rat und Tat in allen Lebenslagen unterstützt haben: Dr. Anne Petz und Dr. Christian Hundhausen. Ihr beiden wart mir eine große Hilfe, nicht zuletzt auch beim Korrekturlesen dieser Arbeit. Ein weiterer Dank gilt Dominik Semmler für die Operation der Infarkte und Dr. Simone Gorressen für die Auswertung der Echos. Auch möchte ich mich bei „den TAs“ für ihre Unterstützung im Labor bedanken, vor allem Peggy Marra-Mann, Petra Rompel und Martina Hübel. Ich danke natürlich auch allen Kolleginnen und Kollegen, die durch ihre Anwesenheit - und teils auch Abwesenheit - für eine gute Atmosphäre gesorgt haben. Besonders den vielen Kolleginnen, mit denen ich über die Zeit den Keller geteilt habe. Allen voran ist mir Katja Wegener mit ihrer positiven und direkten Art ans Herz gewachsen (Ich verzeihe dir, dass du mein Bürowaschbecken verdrängt hast). Dr. Rebekka Schneckmann möchte ich für die vielen philosophischen und pharmazeutischen Diskussionen danken, die immer wieder geholfen haben, auch das Studienwissen wach zu halten. Bei Ramona Quednau und Petra Pieres bedanke ich mich für die organisatorischen Hilfen.

Abschließend geht auch ein Riesendank in mein persönliches Umfeld. Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie immer hinter mir stehen und meine Mutter mich erst auf die Idee eines Pharmaziestudiums brachte. Auch meinen Freunden, vor allem Simon Stettner, danke ich für die offenen Ohren in der ein oder anderen Sinnkrise. Abschließend geht der größte Dank an Clara Lamm, die mich bereits seit der Schulzeit durch Abitur, Studium und jetzt auch Promotion begleitet hat. Danke für die viele Geduld, die vielen Arschritte und deine bedingungslose Unterstützung in allen Lebenssituationen.

15 Eidesstattliche Erklärung

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 30.11.2021

Marco Piroth