

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

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

**Rolle der endogenen Hyaluronsäuresynthese bei der
Angiogenese im Mausmodell der unilateralen
Hinterlaufischämie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tobias Lars Driesen

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Zweitgutachter: PD Dr. med. Tobias Ruck

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Driesen, T., Schuler, D., Schmetter, R., Heiss, C., Kelm, M., Fischer, J. & Freudenberger, T., *A systematic approach to assess locoregional differences in angiogenesis*. *Histochemistry and Cell Biology*, 2016. **145**(2): pp. 213-225.

Zusammenfassung

Ischämische Erkrankungen sind von gesamtgesellschaftlich hoher Bedeutung. Laut Zahlen der Deutschen Gesellschaft für Angiologie/Gesellschaft für Gefäßmedizin sind weltweit etwa 202 Million Menschen alleine von der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) betroffen (Lawall et al., 2016).

Die Rolle von Hyaluronsäure (HA) im Kontext ischämischer Erkrankungen ist noch nicht abschließend geklärt. Exogen zugeführte HA-Oligosacchariden sind als pro-inflammatorisch, pro-angiogen und immunstimulierend beschrieben. Im Gegensatz dazu steht die generell zellprotektive Wirksamkeit der hochmolekularen HA-Polymere mit ihren anti-angiogenen und immunsuppressiven Eigenschaften [West et al., (1985); Stern et al., (2007)]. In menschlichem Gewebe tritt hauptsächlich hochmolekulare HA mit Molekulargewichten um 6000 kDa auf (Cowman, 2017), wobei es im Rahmen von gewebeschädlichen Reizen zu einem erhöhten endogenen Auftreten von niedermolekularen HA-Fragmenten kommt [Aya & Stern (2014); Eldridge et al., (2011)].

Um zu bestimmen, ob die endogene Hyaluronsäuresynthese einen Effekt auf die Angiogenese nach Ischämie hat, wurde in dieser Arbeit im Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie anhand von immunhistochemischer Kapillardarstellung das Ausmaß der Angiogenese in ischämischen und nicht-ischämischen Wadenmuskeln von Has3-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Kontrollen bestimmt. Desweiteren wurde untersucht, ob es einen Unterschied in der Akkumulation/Verteilung von HA zwischen den Testgruppen gibt. Während es bei den WT-Kontrollen nach 35 Tagen zu einem Anstieg der Kapillardichte um etwa 30% als Reaktion auf den ischämischen Reiz kam, blieb dieser Anstieg bei den Has3-KO-Tieren vollständig aus. In Bezug auf den HA-Gehalt des Gewebes hingegen zeigte sich kein Unterschied 35 Tage nach Induktion der Ischemie.

HA ist über zahlreiche Mechanismen wie direkte Stimulation von Endothelzellen (Cao et al., 2006), Modulation des inflammatorischen Milieus (Misra et al., 2015) oder Interaktion mit VEGF (Tremmel et al., 2009) in angiogene Prozesse eingebunden. Dabei zeigt diese Arbeit, dass Effekte, die durch exogen zugeführte HA beobachtet werden können, zumindest teilweise auch durch endogene HA-Synthese in Form der HAS3 vermittelt werden können. Welcher Mechanismus für diesen Effekt wesentlich ist, stellt eine interessante Fragestellung für zukünftige Forschung in Bezug auf die Rolle der endogenen HA-Synthese in Bezug auf Angiogenese dar.

Summary

Ischemic diseases represent a high societal burden. According to The German Society of Angiology/Society of Vascular Medicine 202 million people are affected by peripheral arterial occlusive disease (Lawall et al., 2016).

The role of hyaluronic acid (HA) in the context of ischemic diseases is not yet fully understood. When exogenously applied, HA oligosaccharides are described as pro-inflammatory, pro-angiogenic and immunostimulatory. In contrast, high molecular weight HA polymers are described as cell-protective due to their anti-angiogenic and immunosuppressive properties [West et al., (1985); Stern et al., (2007)]. In human tissue, HA occurs mostly as high molecular weight HA with a molecular weight around 6000 kDa (Cowman, 2017). Nevertheless, tissue damaging stimuli lead to an increased endogenous abundance of low molecular weight HA [Aya & Stern, (2014); Eldridge et al., (2011)].

To determine whether endogenous HA synthesis has an effect on angiogenesis after ischemia, unilateral hind limb ischemia was induced in Has3-KO-mice and WT-control. Immunohistochemical staining of capillaries in ischemic and non-ischemic calf muscle of both groups was performed and the capillary density was determined. Furthermore, the amount and distribution of HA within the muscle tissue was analyzed. While WT-mice showed an increase in capillary density of about 30% 35 days after induction of ischemia, no increase in capillary density was observed for Has3-KO mice. With regard to the HA content, there was no difference between both groups 35 days after induction of ischemia.

HA is involved in angiogenic processes via various mechanisms like direct stimulation of endothelial cells (Cao et al., 2006), modulation of the inflammatory response (Misra et al., 2015) or interaction with VEGF (Tremmel et al., 2009). The present thesis demonstrates that endogenous HA synthesis via HAS3 is able to mediate effects similar to those observed for exogenously supplied HA fragments. Which mechanism this effect might be attributed to poses an interesting question for further research concerning the role of endogenous HA synthesis in context of angiogenesis.

Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon	getABI	<i>German epidemiological trial on ankle brachial index</i>
αSMA	<i>α-smooth muscle actin</i>	H₂O	Wasser
Abb.	Abbildung	H₂O₂	Wasserstoffperoxid
ANG	Angiopoetin	HA	Hyaluronsäure
ANOVA	<i>analysis of variance</i>	HAS	Hyaluronsäuresynthase (human)
ATG	Adenin, Thymin, Guanin	Has	Hyaluronsäuresynthase (murin)
BSA	bovines Serumalbumin	HCl	Chlorwasserstoff
bspw.	beispielsweise	HE	Hämatoxylin-Eosin
cAVK	cerebrale arterielle Verschlusskrankheit	HO1	Hämoxygenase 1
cat. no.	Katalognummer	HYAL	Hyaluronidase (human)
CD	<i>cluster of differentiation</i>	Hyal	Hyaluronidase (murin)
Cre	<i>cyclization recombination</i>	HYALP1	<i>hyaluronoglucosaminidase pseudogene 1</i>
cm	Centimeter	ICD	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Conditions</i>
DAB	Diaminobenzidin	Ig	Immunglobulin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	KCl	Kaliumchlorid
DGA	Deutsche Gesellschaft für Angiologie, Gesellschaft für Gefäßmedizin	kDa	Kilodalton
EZM	Extrazelluläre Matrix	KH₂PO₄	Kalium-Dihydrogenphosphat
FCS	fetales Kälberserum	KHK	Koronare Herzkrankheit
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	K_M	Michaelis-Konstante
Flp	Flippase	KO	<i>Knock-Out</i>
FRT	<i>Flippase recognition target</i>	LoxP	<i>locus of X-over P1</i>
g	Gramm	LDPI	<i>laser doppler perfusion Imaging</i>
Gew	Gewicht		
GAG	Glykosaminoglykan		

μL	Mikroliter	RHAMM	<i>receptor for hyaluronan mediated motility</i>
μm	Mikrometer	ROI	<i>region of interest</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
mL	Mililiter	SEM	<i>standart error of the mean</i>
ms	Milisekunde	SPAM1	<i>sperm adhesion molecule 1</i>
min	Minute	TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
NaCl	Natriumchlorid	TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
Na₂HPO₄	di-Natriumhydrogenphosphat	TIF	<i>tagged image file format</i>
neoR	Neomycin-Geneticin-Resistenzgen	TLR	<i>toll-like receptor</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>	TMEM2	<i>transmembrane proteine 2 (human)</i>
nm	Nanometer	Tmem2	<i>transmembrane proteine 2 (piscin)</i>
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>	UDP-GlcA	Uridindiphosphat-Glucuronat
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit	UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
PE	Polyethylen	VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
PECAM1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>	VPF	<i>vascular permeability factor</i>
PDGF-B	<i>platelet-derived growth factor subunit B</i>	Vol	Volumen
PDGFRβ	<i>platelet-derived growth factor receptor β</i>	VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>
PH-20	<i>sperm surface protein PH-20</i>	WT	Wildtyp
PIGF	<i>placental growth factor</i>		

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1 Atherosklerose.....	1
1.2 Die periphere arterielle Verschlusskrankheit.....	2
1.2.1 Überblick.....	2
1.2.2 Therapiemöglichkeiten.....	4
1.3 Aufbau der Blutgefäße.....	5
1.4 Die extrazelluläre Matrix.....	7
1.5 Hyaluronsäure.....	8
1.5.1 Synthese.....	9
1.5.2 Postsynthetische Degradation.....	9
1.5.3 Hyaladherine.....	11
1.6 Die Glykokalix.....	12
1.7 Angiogenese.....	13
1.7.1 Definition.....	13
1.7.2 Zellulärer Mechanismus.....	14
1.7.3 VEGF-A als wesentlicher Mediator der Angiogenese.....	16
1.8 Das Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie.....	17
1.9 Die Hyaluronsäuresynthase-3 defiziente Maus.....	18
1.10 Ziele der Arbeit.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Verwendete Materialien.....	21
2.2 Verwendete Gerätschaften.....	22
2.3 Reagenzienvorbereitung.....	23
2.4 Vorbereitung.....	23
2.5 Immunhistochemische Färbung.....	27
2.5.1 Fluoreszenzfärbung von CD31 und α -SMA.....	27
2.5.2 DAB-Färbung von Hyaluronsäure.....	28
2.6 Mikroskopie.....	30
2.6.1 Fluoreszenzmikroskopie.....	30
2.6.2 Lichtmikroskopie.....	30

2.6.3	Auswahl der Gesichtsfelder.....	31
2.7	Bestimmung der Kapillardichte.....	34
2.8	Bestimmung des HA-Gehalts.....	36
2.9	Vergleich der Proben.....	36
2.10	Statistik.....	37
3.	Ergebnisse.....	38
3.1	Effekt von Hyaluronsäuresynthase-3-Defizienz im Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie.....	38
3.2	Kapillardichte.....	38
3.2.1	Nicht-ischämischer Hinterlauf.....	38
3.2.2	Ischämischer Hinterlauf.....	39
3.2.3	Testgruppen-interner Vergleich und Ischämisch-zu-Nicht-ischämisch-Quotient.....	41
3.3	Hyaluronsäuregehalt im Gewebe.....	43
4.	Diskussion.....	45
4.1	Die verwendeten Antikörper.....	45
4.2	Der Has3- <i>Knock-Out</i> -Phänotyp.....	46
4.3	Die endogene HA-Synthese im Kontext von vaskulären Pathologien.....	47
4.3.1	Atherosklerose.....	47
4.3.2	Ischämie.....	49
4.4	Effekt der Has3-Defizienz auf die Angiogenese nach induzierter unilateraler Hinterlaufischämie.....	50
4.4.1	Nicht-invasiver Vergleich der Hinterlaufperfusion in Vorarbeiten.....	50
4.4.2	Histologischer Vergleich.....	52
4.5	Mögliche Mechanismen.....	53
4.5.1	Modulation von Inflammation durch HA.....	54
4.5.2	Interaktion von HA mit VEGF.....	55
4.5.3	Die Rolle der Rezeptoren: CD44 und RHAMM.....	56
4.5.4	Die glatte Gefäßmuskulatur.....	59
4.6	Akkumulation von Hyaluronsäure.....	62
4.7	Therapeutische Perspektiven.....	63

4.8 Schlussfolgerung.....	65
4.8.1 Zusammenfassende Beantwortung der Fragestellung.....	65
4.8.2 Fazit.....	66
5. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	68

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose

Atherosklerose bezeichnet die Veränderung der Gefäßwände der Blutgefäße des arteriellen Systems durch zunehmende Einlagerung von lipidhaltigen Plaques, auch Atherome genannt, in die innerste Schicht der Gefäßwand, der *Tunica intima* (Skålén et al., 2002). Der Begriff Arteriosklerose beschreibt historisch die Sklerosierung von arteriellen Gefäßen durch pathologische Prozesse in der muskelführenden Schicht der Gefäßwand, der *Tunica media*. Diese Pathogenese spielt im Vergleich zur Sklerosierung und Stenosierung über degenerative Prozesse an der *Tunica intima* heutzutage eine untergeordnete Rolle, sodass beide Bezeichnungen heute meist simultan für die Bezeichnung des Prozesses der Atherosklerose genutzt werden. Die *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Conditions* in der aktuell gültigen zehnten Auflage ([ICD-10](#)) nutzt ebenfalls den Begriff Atherosklerose. Neben der reinen Retention und Akkumulation von Lipiden spielt die Aufrechterhaltung eines inflammatorischen Milieus innerhalb der Plaques eine entscheidene Rolle für den weiteren Progress der Erkrankung und die Entstehung von instabilen Plaques (Ross, 1999).

Im weiteren Sinne meint die Bezeichnung Atherosklerose den pathologischen Zustand der aus der Sklerosierung resultierenden zunehmenden Stenosierung der betroffenen Gefäße und, als Konsequenz daraus, Durchblutungsstörungen im nachgeschalteten Versorgungsgebiet.

Je nach betroffenem arteriellen Versorgungsgebiet wird die daraus resultierende Durchblutungsstörung als eigene Erkrankung gesondert bezeichnet. Beispiele sind etwa die koronare Herzerkrankung (KHK) bei Stenosierung der Koronararterien, die cerebrale arterielle Verschlusskrankheit (cAVK) bei Plaquebildung in der *Arteria carotis* oder die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) bei Minderdurchblutung der Becken- oder Beinstrombahn. Diese Erkrankungen weisen zudem eine hohe Koinzidenz auf und sind aufgrund des gemeinsamen Pathomechanismus letztlich als verschiedene Ausprägungen derselben Grunderkrankung zu sehen (Duvall & Vorchheimer, 2004).

1.2 Die periphere arterielle Verschlusskrankheit

1.2.1 Überblick

Wie oben erwähnt bezeichnet die periphere arterielle Verschlusskrankheit die eingeschränkte Durchblutung der unteren Extremität durch Stenosierung oder Okklusion arterieller Gefäße unterhalb der *Aorta abdominalis*. Je nach betroffenem Stromgebiet wird dabei in Beckentyp, Ober- und Unterschenkeltyp unterschieden.

In der Mehrzahl der Fälle resultiert dieses Durchblutungsdefizit aus über Jahre bis Jahrzehnte ablaufenden degenerativen und inflammatorischen atherosklerotischen Prozessen, sodass von einer chronischen pAVK gesprochen wird. Hierbei handelt es sich um eine in Industrienationen weit verbreitete Erkrankung, von der laut Angaben der Deutschen Gesellschaft für Angiologie/Gesellschaft für Gefäßmedizin (DGA) etwa 202 Million Menschen weltweit betroffen sind. Die Gesamtprävalenz wird dabei mit 3-10% weltweit angegeben (Lawall et al., 2016). Bei Patienten über 65 Jahren liegt die Prävalenz dabei mit etwa 21% deutlich höher (Diehm et al., 2009). Selten kann es auch zu Minderperfusion der unteren Extremität durch akute thromboembolische Ereignisse in der arteriellen Strombahn kommen. Diese akute Form der pAVK stellt laut der aktuell gültigen S3-Leitlinie der DGA nur eine Minderheit der Fälle dar (Lawall et al., 2016). Wird im Folgenden von pAVK gesprochen, ist hier dabei ausdrücklich die chronische Form gemeint.

Da in Bezug auf die Therapieentscheidung neben der Darstellung von Lokalisation und Ausprägung der Stenosierung die klinische Ausprägung der Symptome maßgeblich ist, erfolgt im klinischen Alltag eine Einteilung des Erkrankungsstadiums in Stadien nach Fontaine oder Kategorien nach Rutherford. Dabei richtet sich die Einteilung nach dem klinischen Beschwerdebild und reicht von dem Befund einer asymptomatischen Gefäßstenosierung (Fontaine I, Rutherford 0) über Schmerzen bei mit fortschreitender Erkrankung abnehmender Gehstrecke (Fontaine II – III, Rutherford 1-3) beziehungsweise in Ruhe (Fontaine III, Rutherford 4) bis hin zu Nekrosenbildung aufgrund der chronischen Ischämie (Fontaine IV, Rutherford 5 & 6). Hervorzuheben ist dabei, dass es schon lange vor manifestem Gewebsuntergang zu deutlichen Ischämieschmerzen kommt, welche mit einer teils deutlichen Einschränkung der Lebensqualität verbunden sind (Donker et al., 2016). Abgesehen von dem Leidensdruck, der durch eine symptomatische pAVK entsteht,

stellen die Erkrankung und aus ihr resultierende Folgepathologien wie kritische Ischämien und thromboembolische Ereignisse eine relevante Todesursache in Deutschland dar (Abb. 1.1). Hervorzuheben ist dabei, dass auch Patienten mit asymptomatischer pAVK bereits eine erhöhte Mortalität gegenüber Nicht-Erkrankten aufweisen (Meves et al., 2010).

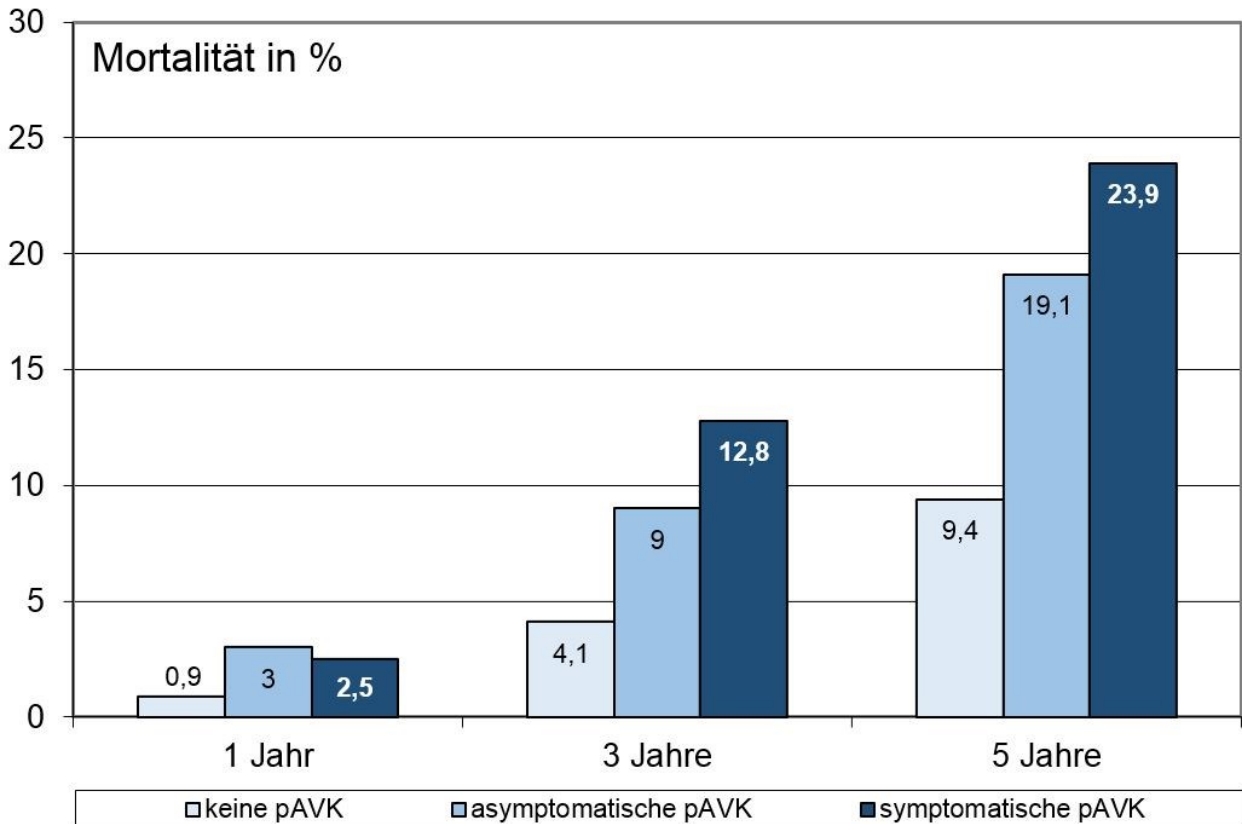


Abb 1.1: Mortalitätsraten nach 1, 3 und 5 Jahren bei Patienten mit symptomatischer und asymptomatischer pAVK im Vergleich zu Patienten ohne pAVK (aus getABI-Studie). Dargestellt sind jährliche Sterberaten (Mortalität) von Patienten mit symptomatischer oder asymptomatischer pAVK gegenüber nicht an pAVK erkrankten Patienten 1, 3 und 5 Jahre nach Diagnose der Erkrankung. Dabei weisen auch Patienten ohne Symptome der Erkrankung eine erhöhte Sterblichkeit bereits 3 Jahre nach Diagnosestellung auf. **Abbildung modifiziert nach Meves et al., (2010).**

1.2.2 Therapiemöglichkeiten

Entsprechende Bedeutung kommt Therapiekonzepten zu, welche der Verbesserung der Perfusion der betroffenen Extremität dienen und der *ultima ratio* einer Majoramputation vorgreifen können. Neben der Behandlung von typischen Risikofaktoren wie hohen Blutfettwerten, Rauchen, Diabetes mellitus und erhöhtem Blutdruck kommt dabei insbesondere in frühen Stadien der Erkrankung der konservativen Therapie, bestehend aus Lauftraining und Thrombozytenaggregationshemmung, eine hohe Bedeutung zu (Burns et al., 2003). Eine weitere Ergänzung der nicht-invasiven Therapie stellt die intravenöse Gabe von Prostaglandinen dar (Tesloianu et al., 2016). Da fortgeschrittene Erkrankungsstadien zudem gehäuft bei hochbetagten und multimorbiden Patienten vorkommen, welche einer chirurgischen Therapie nur sehr eingeschränkt zugänglich sind, behält die konservative Behandlung auch hier ihren Wert (Klaphake et al., 2018). Bei hochsymptomatischen Patienten mit ischämischen Ruheschmerz, aber noch erhaltener Perfusion der Extremität besteht zudem die Möglichkeit einer operativen Therapie mittels Bypass-Versorgung oder einer endovaskulären Intervention, gegebenenfalls mit Stentimplantation, jeweils auf verschiedenen Höhen (Adam et al., 2005).

Bedingt durch den charakteristischen chronischen Verlauf der pAVK sowie der Abhängigkeit des Krankheitsbildes von oftmals fortbestehenden Risikofaktoren kommt es jedoch auch nach invasiver Therapie zu einem sekundären Progress der Erkrankung, welcher bis zu einem Verlust der Extremität reichen kann (Abb. 1.2). Eine mögliche Optimierung der konservativen Therapiemöglichkeiten, sei es als Alternative oder als Ergänzung zur invasiven Therapie, bleibt daher von hoher klinischer Relevanz.



Abb 1.2: Vollbild einer trockenen Nekrose des Unterschenkels bei pAVK. Üblicherweise erfolgt ein Arztkontakt und Therapiebeginn in weit früheren Erkrankungsstadien, sodass solch ausgeprägte chronische Ischämien insgesamt ein seltener Befund sind. Eine andere Therapie als eine vollständige Amputation ist hier nicht mehr möglich. Man beachte auch das kleine Nekroseareal an der Ferse der Gegenseite als Ausdruck der generalisierten Gefäßpathologie. **Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. W. Lehmann, Direktor der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie, Universitätsmedizin Göttingen.**

1.3 Aufbau der Blutgefäße

Das Gefäßsystem des Menschen lässt sich einfach dargestellt in Hoch- und Niederdrucksystem einteilen. Während im Niederdrucksystem das Blut in venösen Gefäßen zum Herzen hin gefördert wird, erfolgt im Hochdrucksystem die Verteilung des Blutes vom Herzen in die Peripherie. Den unterschiedlichen Anforderungen an die herrschenden Druckverhältnisse entsprechend unterscheiden sich die Gefäße des venösen und arteriellen Systems trotz grundlegend gleicher Architektur in ihrem Aufbau.

Die Venen dienen vor allem als Kapazitätsgefäße und verfügen dementsprechend über eine ausgeprägte Bindegewebsschicht mit elastischen kollagenen Fasern in der *Tunica adventita* und nur eine schwache Muskelschicht in der *Tunica media*. Arterielle Gefäße

hingegen sind einerseits den Druckspitzen der systolischen Herzaktion direkt ausgesetzt, andererseits dienen sie in ihren Versorgungsgebieten durch Anpassung des Gefäßradius auch als Regulatoren des Blutflusses. Sie sind deshalb durch eine starke *Tunica media* mit zirkulär angeordneter glatter Muskulatur gekennzeichnet (siehe Abb. 1.3 und Abb. 1.4).

Beiden Gefäßtypen gleich ist innerste Auskleidung des Lumens durch eine dünne Schicht von längs der Flussrichtung angeordneten Endothelzellen, welche zusammen mit ihrer Basalmembran die *Tunica intima* bilden. Diese ist im arteriellen System unter anderem durch Druck- und Strömungsverhältnisse stärkerer Belastung als im venösen Niederdrucksystem ausgesetzt und stellt den Entstehungsort der Pathologie der Atherosklerose dar. Auf kapillarer Ebenen bestehen die Blutgefäße nur noch aus dem Endothel der *Tunica intima* und einer aufgelagerten Schicht von als Stütz- und Regulatorzellen dienenden Perizyten (Lin et al., 2011).

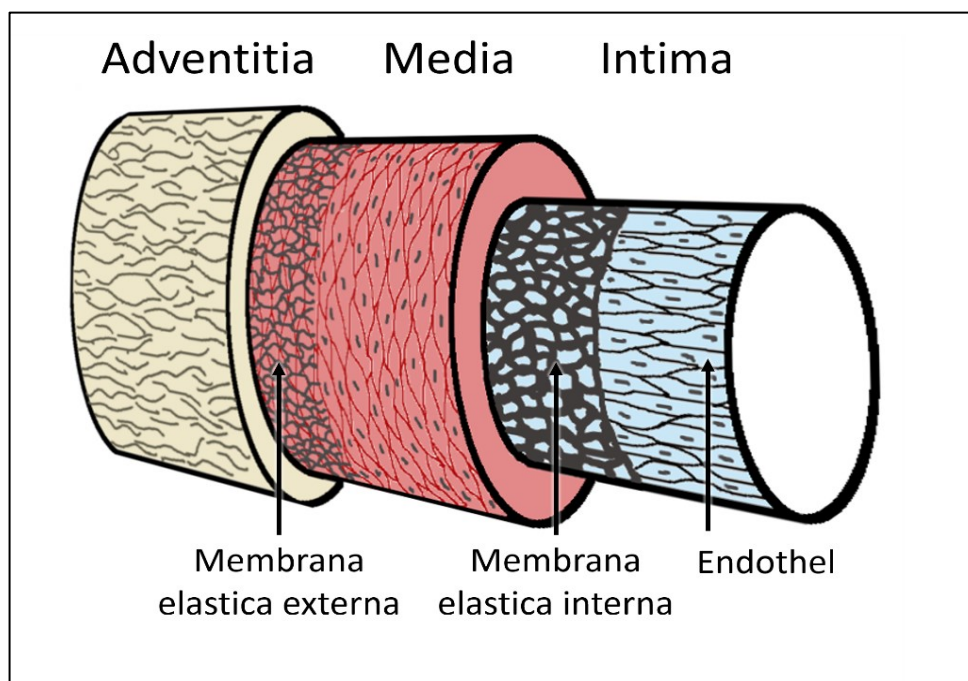


Abb 1.3: Aufbau eines Blutgefäßes. Hier gezeigt anhand eines arteriellen Gefäßes mit deutlicher *Tunica media*, bestehend aus quer zum Lumen ausgerichteten glatten Muskelzellen. Die drei Schichten der Gefäßwand werden durch zwei dünne Schichten elastischer Kollagenfasern (*Membrana elastica interna et externa*) von einander getrennt. **Eigene Abbildung nach Welsch (2010).**

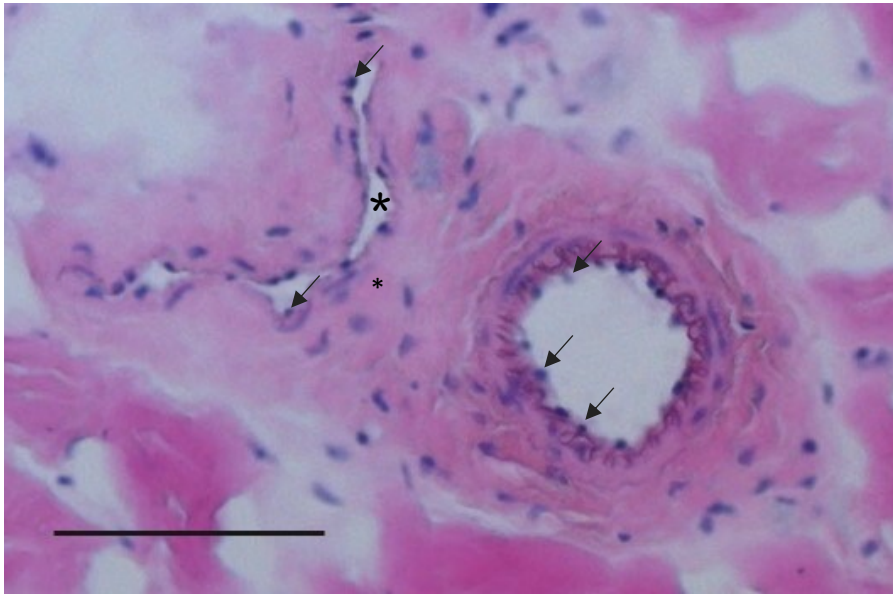


Abb. 1.4: Arteriell und venöses Gefäß in HE-Färbung. Rechts dargestellt ist ein Gefäß der arteriellen Strombahn mit ausgeprägter muskelstarker *Tunica media*. Links befindet sich ein venöses Gefäß mit erkennbar zarter Wandung. Man beachte das aufgrund der nur schwach ausgeprägten Muskulatur kollabierte Lumen nach Fixierung (*Asterisk*). Die *Pfeile* zeigen Beispiele für die Zellkerne des Endothels der *Tunica intima*. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm. **Eigene Abbildung auf Basis selbstangefertigter Aufnahme.**

1.4 Die extrazelluläre Matrix

Nicht nur die Blutgefäße, sondern nahezu jeder Zellverbund des menschlichen Körpers besteht nicht nur aus der jeweils ihn charakterisierenden Zellpopulation, sondern ist in ein umgebendes Gewebe eingebettet. Dieses als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnete Gewebe stellt nicht lediglich eine mechanische Stütze dar, wie zu Beginn der Matrixforschung angenommen, sondern ist über zahlreiche Prozesse und Bestandteile selbst regulatorisch aktiv (Ramirez & Rifkin, 2003). Einen wesentlichen Teil der EZM stellen Glykosaminoglykane (GAG) beziehungsweise Proteoglykane dar. Hierbei handelt es sich um repetitive Disaccharid-Einheiten, welche durch glykosidische Bindungen mit Aminozucker-Gruppen zunächst ein Glykosaminoglykan (GAG) bilden. Ist dieses wiederum O-glykosidisch mit Proteingruppen verbunden, liegt ein Proteoglykan vor. Besagte Proteingruppe wird auch als *core protein* bezeichnet (Esko et al., 2009).

Je nach biochemischer Beschaffenheit nehmen diese unterschiedliche Funktionen innerhalb der EZM ein. So stellen etwa Decorin und Biglycan durch Bindung diverser Bindegewebsbestandteile unter anderem die funktionale Integrität des Gewebes her

(Corsi et al., 2002). Andere, wie beispielsweise das in Knorpelgewebe stark vertretende Aggrecan modifizieren über ihre hohe Wasserbindungskapazität den Tugor des Gewebes und bestimmen dessen Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischer Belastung (Roughley & Mort, 2014). Darüber hinaus sind Bestandteile der EZM in unterschiedlichste zelluläre Prozessen wie Proliferation, Migration, Zell-Zell-Interaktion, Regulierung der Genexpression und Sekretion involviert [Gorsi et al., (2007); Vlodavskyy et al., (2002); Iozzo (2005)]. Dies gilt sowohl für den Fall der physiologischen Zellfunktion als auch im Falle verschiedener Erkrankungen. So findet sich etwa im Tiermodell bei Biglycan-Defizienz eine abnormale Elastizität des Bindegewebes (Corsi et al., 2002) sowie eine erhöhte Rate an Gefäßschäden (Tang et al., 2014). Decorin-Defizienz wiederum ist mit einer erhöhten Wachstumsrate von neoproliferativen Tumoren assoziiert (Iozzo et al., 1999), ebenso wie im Umkehrschluss ein generell anti-proliferativer Effekt von Decorin auf zahlreiche Tumorentitäten beschrieben ist (Järvinen & Prince, 2015). Abnormale Zusammensetzungen der EZM lassen sich zudem bei zahlreichen weiteren vaskulären und neoproliferativen Pathologien nachweisen (Toole et al., 2002).

1.5 Hyaluronsäure

Einen weiteren wesentlichen Bestandteil der EZM stellt Hyaluronsäure (HA) dar. Einzug in die Literatur erhielt HA über ihre Identifizierung als Komponente des Glaskörpers im Auge (Meyer & Palmer, 1934). Sie findet sich allerdings in allen Geweben des menschlichen Körpers und kommt neben dem Glaskörper noch in der Gelenksynovia, der Haut, den Herzklappen sowie der Skelettmuskulatur gehäuft vor (Liang et al., 2016). Inzwischen ist sie Teil zahlreicher medizinischer Anwendungen, etwa als intraartikuläre Injektion mit erhoffter chondroprotektiver Wirkung (Knudson & Knudson, 2004) oder als biologisch verträglicher Volumenersatz in verschiedenen Geweben (Balazs & Band, 2008). Auch als biologische Grundsubstanz für verschiedene Medikamententrägermatrizen findet HA pharmakologische Anwendung (Ju et al., 2014). Sie ist zudem aufgrund ihrer Einbindung in vielschichtige biologische Prozesse wie Zellproliferation, -migration, Inflammation, Angiogenese und Wundheilung aktiver Gegenstand der Forschung (Liang et al., 2016).

HA besteht aus einer sich wiederholenden Sequenz aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin. Diese Sequenz unterliegt weder wie andere Mitglieder der GAG-Familie weiteren Modifikationen wie Sulfatierung oder N-Acetylierung, noch ist sie an ein *core*

protein gebunden. HA stellt somit einen Sonderfall unter den GAG dar (Pardue et al., 2008).

1.5.1 Synthese

Dies gilt auch für die Produktion von HA. Diese geschieht nicht wie bei den übrigen GAG durch intrazelluläre Synthese über den Golgi-Apparat und anschließenden Transport nach extrazellulär mittels Exozytose. Stattdessen wird HA durch die membranständige Hyaluronsäuresynthase (HAS) gebildet. Dabei werden Uridindiphosphat-Glucuronat (UDP-GlcA) und UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) über β -1 \rightarrow 3- und β -1 \rightarrow 4-glycosidische Bindungen miteinander konjugiert und die so entstehenden HA-Ketten direkt in den Extrazellulärraum extrudiert (Vigetti et al., 2014). Es existieren drei Isoenzyme der HAS, welche in der humanen Form als HAS1, -2 und -3, in der murinen Variante als Has1, -2 und -3 bezeichnet werden. Diese weisen unterschiedliche K_M -Werte für Ihre Substrate und dementsprechende Syntheseraten auf (Itano et al., 1999).

Frühe Experimente führten zu der Annahme, dass sich die HA-Synthasen bezüglich der Länge der jeweils produzierten HA-Ketten unterschieden (Spicer & McDonald, 1998). In Folgestudien konnte allerdings nachgewiesen werden, dass alle drei Enzyme in der Lage sind, hochmolekulare HA ($>1 \times 10^6$ Da) zu synthetisieren (Spicer & Tien, 2004). Während der Embryogenese der Maus nehmen die Enzyme jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten für bestimmte Prozesse der Embryonalentwicklung spezifische Funktionen ein, wobei der Has2 eine dominante Rolle zukommt (Spicer & McDonald, 1998). Auch im adulten Organismus weisen verschiedene Zell- beziehungsweise Gewebetypen ein unterschiedliches Verteilungsmuster der HAS-Isoformen auf. Ebenso unterscheiden sich diese trotz hoher strukturelle Ähnlichkeit in Bezug auf Regulationsmechanismen und in ihrer Reaktion auf externe Stimuli (Heldin et al., 2019). Die genaue Relevanz der einzelnen Isoformen bei verschiedenen Erkrankungen bietet weiterhin Raum für wissenschaftliche Forschung.

1.5.2 Postsynthetische Degradation

Die biologische Wirksamkeit der HA wird dabei von ihrer Molekulargröße beeinflusst, welche einerseits während der Synthese, zum wesentlichen Teil aber zudem durch postsynthetische Degradation bestimmt wird (Fischer & Schrör, 2007). Diese Degradation

erfolgt *in vivo* einerseits über als Hyaluronidasen bezeichnete Enzyme, andererseits nicht-enzymatisch durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Stern et al., 2007). Als Beispiel für eine physiologisch auftretende ROS sei hier das Hyperoxid-Anion $O_2^{\cdot-}$ genannt, welches von Leukozyten im Rahmen von inflammatorischen Prozessen gebildet wird und eine Fragmentierung langkettiger HA bewirkt (Rees et al., 2004).

Der Großteil der HA-Degradierung erfolgt aber enzymatisch über die Hyaluronidasen. In der Literatur gut etabliert sind dabei sechs Vertreter dieser Enzymgruppe, namentlich HYAL 1-4 sowie PH-20/SPAM1 und das Pseudo-Gen-Produkt HYALP1 (Csoka et al., 2001). Erst seit relativ kurzer Zeit ist mit dem *transmembrane protein* (TMEM) 2 ein neues Enzyme mit Hyaluronidaseaktivität beschrieben. Dieses ist im Gegensatz zu den übrigen Hyaluronidasen an der Zelloberfläche lokalisiert und scheint die initiale Spaltung der HA-Ketten der EZM einzuleiten (Yamamoto et al., 2017). PH-20 wird auch als testikuläre Hyaluronidase bezeichnet, ist auf Spermatozoen exprimiert und im Rahmen der Befruchtung von Eizellen aktiv (Cherr et al., 2001). Im somatischen Gewebe kommt insbesondere Hyal-1 und Hyal-2 eine bedeutende Rolle für den physiologischen Hyaluronsäure-Metabolismus zu (Bourguignon & Flamion, 2016). Durch Spaltung der β -1 \rightarrow 4-glycosidischen Bindungen der HA-Makromoleküle entstehen letztendlich niedermolekulare HA-Fragmente, deren biologische Wirksamkeit sich deutlich von jener der hochmolekularen HA unterscheidet.

So wurden für die niedermolekularen Fragmente pro-inflammatorische, pro-angiogene und immunstimulierende Effekte beobachtet. Die hochmolekularen HA-Polymere werden hingegen im Gegensatz dazu über anti-angiogene und immunosuppressive Effekte als generell zellprotektiv wirksam beschrieben [West et al., (1985); Stern et al., (2007)]. Somit lässt sich grob eine Unterscheidung zwischen der katabolen Natur der niedermolekularen Fragmente treffen, die ihrem gehäuften Vorkommen bei Zelluntergang, -abbau und -umbau Rechnung trägt (Jiang et al., 2011), sowie der primär Gewebe-erhaltende Funktion der langkettigen HA im Rahmen der Homöostase (Stern et al., 2006). Ohne besondere Provokation liegt HA in menschlichem Gewebe hauptsächlich als hochmolekulare HA mit Molekulargewichten um 6000 kDa vor (Cowman, 2017). Das Auftreten von niedermolekularen HA-Fragmenten unterliegt hingegen situativen

Schwankungen, HA-Fragmenten sind als Reaktion auf gewebebeschädliche Reize vermehrt nachweisbar [Aya & Stern, (2014); Eldridge et al., (2011)].

1.5.3 Hyaladherine

Eine Vielzahl der durch HA beeinflussten Prozesse wird über Hyaluronsäure-bindenden Proteinen vermittelt. Diese werden auch als Hyaladherine bezeichnet. Zwar sind zahlreiche Hyaladherine beschrieben, die wesentliche HA-vermittelte Signalübertragung erfolgt aber laut aktueller Literatur über CD (*cluster of differentiation*) 44 sowie RHAMM (*receptor for hyaluronan mediated motility*) (Day & Prestwich, 2002). Bei CD44 handelt es sich um ubiquitär vorkommendes Transmembranprotein mit einer N-terminalen extrazellulären HA-bindenden Domäne sowie einem zytoplasmatischen C-terminalen Anteil mit Phosphorylierungsdomänen, über welche eine intrazelluläre Interaktion mittels Tyrosinkinase-Signalwegen vermittelt wird. Durch alternatives *Splicing* kann CD44 in verschiedenen Isoformen auftreten (Misra et al., 2015). RHAMM findet sich ebenfalls ubiquitär auf Zelloberflächen, besitzt allerdings keine transmembranäre Domäne, sondern ist über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker in der Zellmembran befestigt. Ein weiterer Unterschied zu CD44 besteht im zusätzlichen Auftreten von RHAMM im Zytosol sowie im Zellkern. Die HA-Bindung erfolgt über eine C-terminale Bindungsdomäne (Misra et al., 2015).

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden zahlreiche von diesen Rezeptoren vermittelte Signalwege beschrieben. Im physiologischen Kontext kommen beiden Rezeptoren dabei Funktionen in der Zellhomöostase zu, insbesondere bei der Regulation von proliferativen Prozessen und Zellmigration (Turley et al., 2002). Passend dazu ist verstärkte CD44-Expression im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen mit einer erhöhten Invasivität und Proliferationsrate der Tumore assoziiert. Auch RHAMM-Signalübertragung ist im Kontext von Tumorerkrankungen mit einer erhöhten apoptotischen Resistenz der Tumorzellen assoziiert (Misra et al., 2015). Die Bedeutung der durch endogene HA vermittelten Zellkommunikation im Rahmen angiogener Prozesse im pathophysiologischen Kontext ist noch nicht abschließend geklärt.

1.6 Die Glykokalix

Zusätzlich zu der EZM existiert noch eine weitere Struktur, welche den Zellverbund der Gefäßwandung umgibt. Zwischen der *Tunica intima* des Gefäßendothels und dem zirkulierenden Blut befindet sich eine gittergewebsartige Gelstruktur, welche in ihrer Zusammensetzung der EZM ähnelt und als Glykokalix bezeichnet wird. Membranständige Proteoglykane und GAGs wie Heparinsulfat, Chondroitinsulfat und HA bilden die Grundstruktur der Glykokalix. Dadurch ergibt sich eine negative Ladung dieser Gewebsschicht, was bereits aufgrund von elektrostatischen Effekten zu einer Abgrenzung gegenüber ladungstragenden Molekülen im Blut führt. Zudem finden sich dort zahlreiche Glykoproteine aus der Familie der Selektine, Integrine und Immunglobuline. Diese vermitteln Zell-Zell-Kontakte zwischen dem Gefäßendothel und den zellulären Bestandteilen des Blutes (Gaudette et al., 2020). Eine Besonderheit gegenüber der EZM stellen dabei die fadenartigen Ausziehungen dar, welche die Glykokalix-Matrix nach intraluminal bildet. Diese reichen zwischen 100 und 750 nm in das Gefäßlumen hinein (Abb. 1.5). Dabei unterliegt die Dicke der Glykokalix Schwankungen in Abhängigkeit von der Scherbeanspruchung durch den Blutfluss einerseits sowie von pathophysiologischen Zuständen andererseits. So führen etwa Inflammation, ischämische Zustände, Hyperglykämie oder oxidativer Stress zu einer Dichteabnahme (Becker et al., 2010).

Obwohl die Existenz einer dem Gefäßendothel aufliegender Gewebsschicht bereits 1940 postuliert (Danielli, 1940) und 1963 nachgewiesen wurde (Bennet, 1963), blieb deren Bedeutung im Zusammenhang mit vaskulären Prozessen lange unklar. Dies ist zu großen Teilen darauf zurück zu führen, dass gängige Fixierungsmethoden zur Gefäßdarstellung die Glykokalix nicht erhalten. In den letzten Jahrzehnten hat sich dank entsprechenden Fixierungs- und Untersuchungsmethoden ein differenziertes Bild der Glykokalix und ihrer Bedeutung ergeben. So zeigt sich nach Degradation der Glykokalix eine erhöhte Adhäsion von Thrombo- und Leukozyten an das Endothel mit einem daraus resultierenden andauernden inflammatorischen Zustand (Becker et al., 2010). Ebenso führen Schäden an der Glykokalix zu einer verstärkten kapillären Leckage und einer daraus resultierenden vermehrten Extravasation von Flüssigkeit (Bruegger et al., 2005) sowie zu einer Herabsetzung der Blutfluss-vermittelten Gefäßreagibilität (Nieuwdorp et al., 2006).

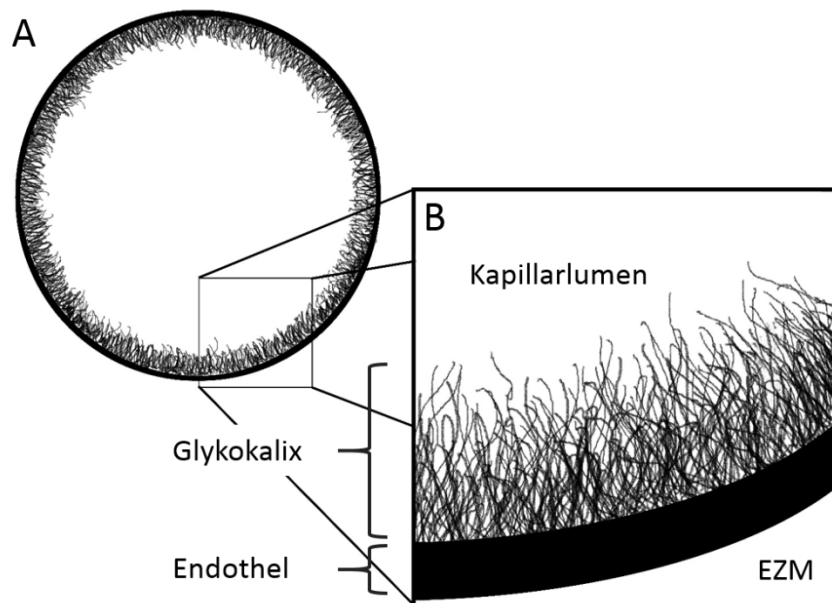


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Glykokalix in einem kapillaren Gefäß. (A) Dargestellt ist ein schematischer Gefäßquerschnitt einer Kapillare mit der Endothelzellschicht und der ihr faserartig erscheinend aufgelagerten Glykokalix, wie sie im elektronenmikroskopischen Bild zur Abbildung kommen würde. Die umgebende EZM ist nicht mit dargestellt. **(B)** Im zehnfach vergrößerten Ausschnitt kommt die fadenartige nach intraluminale ausgerichtete Struktur der Glykokalix zur Darstellung. EZM = Extrazelluläre Matrix. **Abbildungen modifiziert nach Gaudette et al., (2020).**

1.7 Angiogenese

1.7.1 Definition

Der Begriff Angiogenese beschreibt nach gebräuchlicher Definition die Bildungen von neuen Gefäßen oder Gefäßabschnitten aus bereits bestehenden vaskulären Strukturen. Dies grenzt Angiogenese von dem Begriff der Vaskulogenese ab, welcher die vorwiegend im Rahmen der Embryonalentwicklung stattfindende *de novo* Bildung von Gefäßen aus vaskulären Progenitorzellen bezeichnet (Hanahan & Folkman, 1996). Teils wird weiterhin der Begriff Arteriogenese abgegrenzt, welcher die Ausreifung von bestehenden Kapillaren oder kleinkalibrigen Gefäße zu Gefäßen der arteriellen Strombahn (unter Bildung einer *Tunica media*) meint, wie sie etwa bei veränderten Strömungsverhältnissen im Rahmen von Kollateralisierungsprozessen auftritt (Carmeliet, 2000).

1.7.2 Zellulärer Mechanismus

Vorraussetzung für das Ablaufens des im Folgenden als Angiogenese bezeichneten Prozesses ist zunächst ein entsprechender pro-angiogener Reiz, etwa durch eine im an das Gefäß angrenzende Gewebe bestehende Hypoxie. Dies führt zur Aktivierung von verschiedenen Signalmoleküle wie etwa der Gruppe der *vascular endothelial growth factors* (VEGF) oder auch der Angiopoetine (ANG). Vermittelt durch diese kommt es zunächst zu einer Stickstoffmonoxid-initiierten Vasodilatation und Erhöhung der Gefäßpermeabilität in einem zuvor ruhenden reifen Gefäß (Carmeliet, 2000). Ausgewählte Zellen aus der Endothelschicht differenzieren dann unter dem proangiogenen Zytokinmilieu zu sogenannten *tip cells*, welche mit Filopodien ausgestattet sind. Diese erlauben den *tip cells*, aus dem Zellverbund des Endothels in Richtung der pro-angiogenen Signale zu emigrieren (Abb. 1.6B). Die angrenzenden Endothelzellen nehmen die Rolle von sogenannten *stalk cells* ein und sichern damit eine Kontinuität des aussprossenden Zellverbundes zu dem ursprünglichen Gefäß (Abb. 1.6C). Zudem entsteht durch die von den *stalk cells* gebildete Endothelsicht eine vollständige Gefäßinnenwand. Treffen nun Aussprossungen verschiedener Gefäße aufeinander, kann sich aus diesen ein neues unreifes Gefäß mit durchgängigem Lumen formieren. Dieses wird von dem Blutstrom des Ursprungsgefäßes durchspült. Dies wiederum führt zu einer strömungsvermittelten Stimulation der Endothelschicht und initiiert über beispielweise den *platelet-derived growth factor* (PDGF-B) oder *transforming growth factor-β* (TGF-β) eine weitere Reifung des Gefäßastes durch Anlagerung von Perizyten an die Endothelzellen. Diese Perizyten stabilisieren durch Zell-zu-Zell-Kommunikation mit dem Endothel den sich neu bildenden Gefäßast, beispielsweise über Freisetzung von ANG-1 (Herbert & Stainier, 2011), wodurch es zu einer Ausreifung des neugebildeten Gefäßastes kommt (Abb. 1.6D). Sollte ein Blutfluss in den aussprossenden Gefäßabschnitten ausbleiben, kommt es zu einer Rückbildung des Gefäßastes anstatt der Bildung eines reifen Gefäßes (Carmeliet & Jain, 2011).

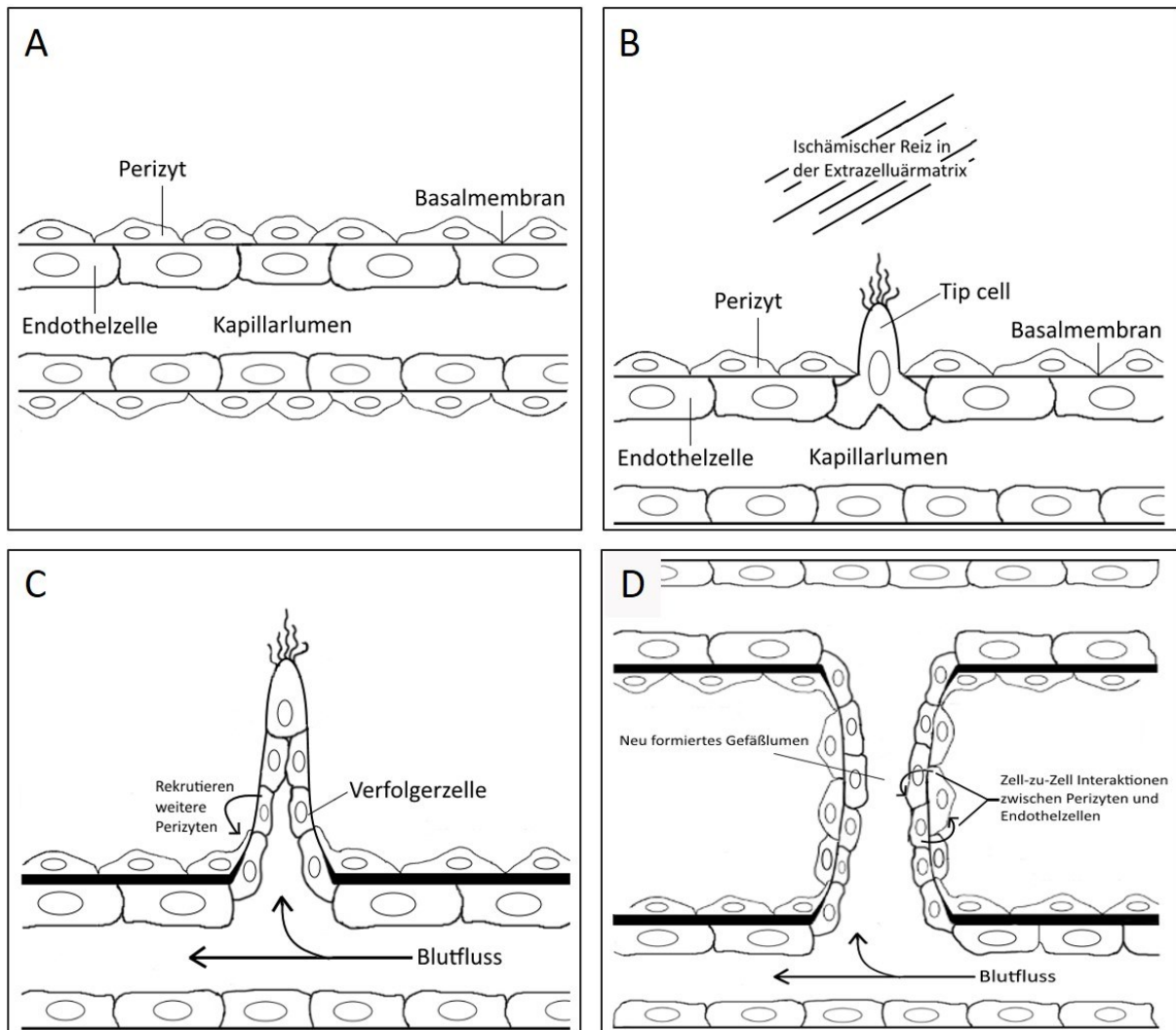


Abb. 1.6: Zellerer Mechanismus der Angiogenese. (A) Schematische Darstellung eines ruhendes reifes Gefäßes. (B) Durch eine Gewebhypoxie kommt es zu einem ischämischen Reiz in der angrenzenden EZM, wodurch sich ausgewählte Endozellen zu sog. *tip cells* differenzieren. (C) Angeführt von diesen *tip cells* bildet sich eine Gefäßaussprossung, welche dem ischämischen Reiz folgt. Durch den Blutfluss in der Aussprossung kommt es zur Aktivierung der *stalk cells* (Verfolgerzellen), welche eine weitere Endothelproliferation sowie Perizytenrekrutierung induzieren. (D) Nachdem diese Aussprossung auf einen weiteren Gefäßast getroffen ist und somit ein durchgängiges Lumen entsteht, interagieren die Endothelzellen und Perizyten des neuen Gefäßabschnittes miteinander, um eine Ausreifung der Zellwandung zu ermöglichen. **Abbildungen modifiziert nach Carmeliet und Jain, (2011).**

1.7.3 VEGF-A als wesentlicher Mediator der Angiogenese

Für das Ablaufen eines physiologischen Angiogeneseprozesses bedarf es einer Vielzahl an Mediatoren. Als prominentester Vertreter der pro-angiogenen Moleküle ist hier die Gruppe der *vascular endothelial growth factors* (VEGF) zu nennen. Zuerst 1983 als *vascular permeability factor* (VPF) (Senger et al., 1983) beziehungsweise 1989 erstmalig als VEGF (Ferrara & Henzel, 1989) beschrieben, handelt es sich hierbei um ein später als VEGF-A bezeichnetes homodimerisches Glykoprotein von etwa 45 kDa Molekulargewicht, verbunden über eine kovalente Bindung mittels zweier Disulfid-Brücken. Im Verlauf der Jahrzehnte wurde die VEGF-Molekülfamilie um VEGF-B, den *placental growth factor* (PlGF), VEGF-C, VEGF-D, den viralen VEGF-E sowie den in Schlangengift vorkommenden VEGF-F erweitert. Über alternatives *Splicing* im Rahmen der Proteinsynthese können von den einzelnen Varianten jeweils noch Isoformen gebildet werden, die sich in ihren Aminosäuresequenzen unterscheiden (Yamazaki & Morita, 2006). Dabei können einzelne Isoformen, hauptsächlich VEGF-A_{165b} auch anti-angiogene Effekte vermitteln (Bates et al., 2002). Von den oben genannten pro-angiogenen Moleküle der VEGF-Gruppe entfaltet insbesondere VEGF-A seine Wirkung über die Interaktion mit zwei membranständigen Tyrosinkinasen-Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen, bezeichnet als VEGF-Rezeptor-1 und -2 (Thomas, 1996). Ein dritter Rezeptor aus dieser Familie, der VEGF-Rezeptor-3, interagiert hauptsächlich mit VEGF-C und -D und vermittelt überwiegende lymphangiogene Prozesse (Ferrara, 2004).

Physiologischerweise spielt VEGF-A im menschlichen Organismus vor allem eine Rolle im Rahmen der Gefäßentstehung während der Embryonalentwicklung. Darüber hinaus gewinnt er aber bei pathologischen Prozessen wieder an Bedeutung. So kommt ihm eine entscheidende Rolle bei Erkrankungen mit angiogenen Prozessen zu, etwa im Rahmen der Neovaskularisierung von Tumoren (Carmeliet, 2005). Diese Erkenntnis führte zu Entwicklung von Inhibitoren der VEGF-A vermittelten Signaltransduktion zur Therapie diverser onkologischer Erkrankungen (Melincovici et al., 2018). Auch im Rahmen der pathologischen Gefäßneubildung bei der feuchten Makuladegeneration stellt eine Injektion von VEGF-A-Antikörpern eine Therapieoption dar (Finger et al., 2007). Eine klinische Anwendung des pro-angiogenen Effektes von VEGF-A existiert bislang nicht.

Im Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie als Tiermodell für eine kritische Extremitätenischämie zeigte sich nach Überexpression von VEGF-A zwar eine Erhöhung der sonographisch gemessenen Perfusion und der Neovaskularisierung in der Unterschenkelmuskulatur, jedoch keine Auswirkung auf die Bildung von Arteriolen im Oberschenkel (Jazwa et al., 2015). Beschrieben ist zudem eine erhöhte Verlustrate des Hinterlaufs im besagten Mausmodell nach Überexpression von VEGF-A durch Ödembildung und Muskelzellnekrose (Masaki et al., 2002).

1.8 Das Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie

Um angiogene Vorgänge und mögliche Einflussfaktoren auf diese untersuchen zu können, bedarf es eines reproduzierbaren, belastbaren und praktisch umzusetzenden Tiermodells. Die Maus hat sich in der Wissenschaft bei verschiedensten Fragestellungen aufgrund ihrer grundlegenden biologischen wie genetischen Ähnlichkeit zum Mensch sowie der verhältnismäßig einfachen Möglichkeit zur genetischen Manipulation als das maßgebliche Versuchstier der Gattung der Säugetiere etabliert (Denny & Justice, 2000). Die Maus besitzt ein grundlegend evolutionär dem Menschen gleich aufgebautes zweigeteiltes Blutkreislaufsystem. In diesem wird die untere Extremität ab Höhe des Beckens von einem arteriellen Gefäß, der *Arteria femoralis* versorgt. Diese teilt sich erst später in kleinere arterielle Gefäßäste auf. Damit bietet sich die Möglichkeit, durch operative Manipulation an einem gut zugänglichen, auch makroskopisch darstellbaren Gefäß eine relevante Ischämie in dem funktionellen Endstromgebiet der unteren Extremität zu erzeugen und die Folgen dieser zu untersuchen. Da es sich bei der Induktion um eine Manipulation an einem peripheren Gefäß handelt, ist die perioperative Mortalität im Gegensatz zu Manipulationen an cardialen oder cerebralen Gefäßen zudem niedrig (Niiyama et al., 2009). Auch steht mit der Gegenseite eine tierinterne, nicht-ischämische Referenz zur Verfügung.

1.9 Die Hyaluronsäuresynthase-3 defiziente Maus

Zur Untersuchung des Einflussfaktors der endogenen Hyaluronsäuresynthase bedurfte es daher einer Maus, deren endogene Synthese im Vergleich zum Wildtypen kompromittiert ist. Mittels molekulargenetischer Methoden wurde daher im Vorfeld durch die Firma genOway (Lyon Cedex, Frankreich) eine Maus erzeugt, die keine funktionelle Has3 exprimiert.

Hierzu wurde das Exon2 des murinen Has3-Gens komplett durch das für die humane HAS3 kodierende menschliche Gen ersetzt. Als positiver Selektionsmarker fand hierbei das Neomycin-Geneticin-Resistenzgen *neoR* Verwendung. Dieses ist mittels zweier FRT-Sequenzen markiert und wurde über eine Rekombination mit einem Flippase-tragenden Mausstamm entfernt. Es verbleibt das von zwei loxP-Sequenzen flankierte HAS3-Gen. Diese fungieren als Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase. Die loxP-markierte Maus wurde anschließend mit einer Cre-Rekombinase tragenden Maus verpaart. Dadurch kam über Rekombination der zwischen den loxP-Sequenzen gelegenen Erbinformationen zu einem genetischen Verlust des Exon2. Anschließend wurde der so generierte *Knock-Out*-Stamm über mehrere Generationen zu dem ursprünglichen Wildtypstamm C57BL/6J der Firma Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) zurückgekreuzt. Die am Ende erzeugte *Has3-Knock-Out*-Maus produziert also durch das Fehlen des Exon2 keine funktionierende Hyaluronsäuresynthase-3 mehr, ist aber ansonsten genetisch identisch zu denen als Wildtypvergleich dienenden C57BL/6J Mäusen (siehe auch Abb. 1.7). Dieses Verfahren zur Generierung bestimmter *Knock-Out*-Phänotypen stellt einen etablierten Standard dar (Belizário et al., 2012).

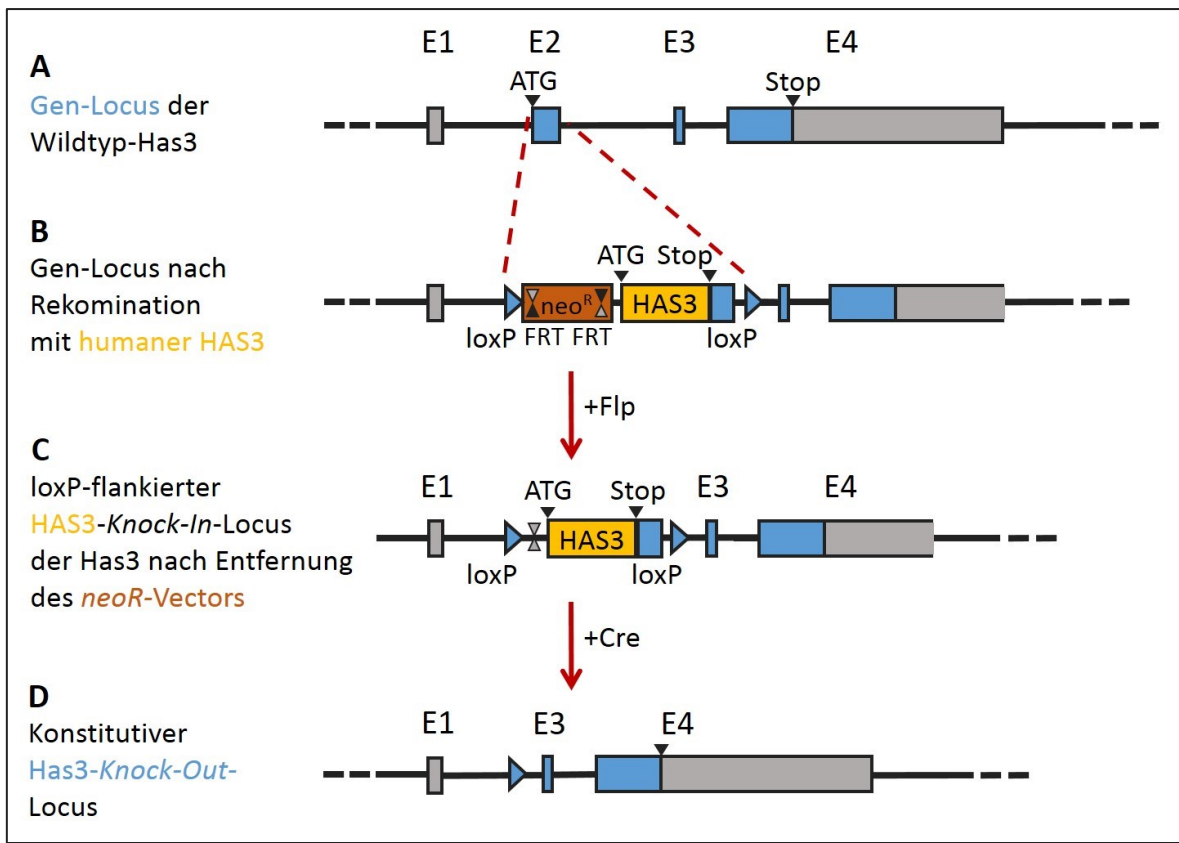


Abb. 1.7: Knock-Out der Gensequenz des für Has3 codierenden Gens in der Has3-KO-Maus. Die für die Has3 codierende Gensequenz trägt ihr ATG-Startcodon auf dem Exon2 (A). Diese Sequenz wird zunächst durch die für die humane HAS3 codierende Gensequenz ersetzt (B). Anschließend wird zunächst der *neoR*-Markierungsvector mittels des Flippase(Flp)-Enzyms entfernt. Es verbleibt die HAS3-Sequenz, welche von zwei loxP-Sequenzen flankiert wird (C). Diese werden von der Cre-Rekombinase erkannt und die Sequenz dazwischen entfernt. Das Erbgut des so entstandenen Mausstammes codiert also durch induzierten genetischen Verlust des Startcodon-tragenden Exon2 nicht mehr für eine funktionable Has3 (D). **Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. J. Fischer, Direktor des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf.**

1.10 Ziele der Arbeit

Da es, wie eingangs dargestellt, Unterschiede in der Wirkung von exogen applizierter Hyaluronsäure auf angiogene Prozesse in Abhängigkeit von der Art der Applikation, als auch der molekularen Beschaffenheit gibt, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die endogene Hyaluronsäuresynthese einen Effekt auf die Angiogenese nach Ischämie hat. Es ergeben sich dabei zwei konkrete Fragestellungen:

- 1.) Gibt es einen Unterschied im Ausmaß der Angiogenese im Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie im Vergleich der ischämischen und nicht-ischämischen Wadenmuskeln von Hyaluronsäuresynthase(Has)-3 defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp(WT)-Kontrollen?

- 2.) Gibt es Unterschiede in der Akkumulation/Verteilung von Hyaluronsäure in der ischämischen und nicht-ischämischen Wadenmuskulatur von Has3 defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp(WT)-Kontrollen?

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

- Männliche Mäuse (C57BL/6J Mäuse) im Alter von 17 – 20 Wochen, Wildtypen (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) sowie Has3-*Knock-Outs* (genOway, Lyon Cedex, Frankreich)
- Sucrose [Saccharose, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, cat. no.: 1076875000]
- Kryopreservations-Medium [KP-CryoCompound, Frozen Tissue Medium, Klinipath BV, Duiven, Niederlande, cat. no. 1620-C]
- Flüssiger Stickstoff (bspw. Linde AG, München, Deutschland)
- 2-Methylbutan $\geq 99,5\%$ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, cat. no. 59070)
- Aceton $\geq 99,5\%$ (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, cat. no. 5025)
- Destilliertes Wasser
- Kaliumchlorid (KCl) (Merck, cat. no. 104936)
- Kalium-Dihydrogen-Phosphat (KH_2PO_4) (Merck, cat. no. 104873)
- di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$) (Merck, cat. no. 106580)
- Natriumchlorid (NaCl) (Carl Roth, cat. no. 3957.1)
- Chlorwasserstoffsäure (z.B. 10 % HCl; Carl Roth, cat. no. 0710)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Trizma[®] base, Sigma-Aldrich, cat. no. T1503)
- Fetales Kälberserum (FCS) (Life Technologies, Carlsbad, USA, cat. no. 10270-098)
- Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich, cat. no. A9418)
- Anti-CD31 Antikörper[MEC 7.46] (ab7388) (Abcam, Cambridge, UK, cat. no. ab7388)
- *Rhodamin Red X anti-rat* Antikörper (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, USA, cat. no. 112-295-167)
- *Anti-alpha smooth muscle Actin* Antikörper (ab5694) (Abcam, cat. no. ab5694)
- *Alexa Fluor 488[®] goat anti-rabbit IgG* Antikörper (Life Technologies, cat. no. A-11008)
- Roti[®]-Mount FluorCare DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol; Carl Roth, cat. no. HP20.1)
- Roti[®]-Mount (Carl Roth, cat. no. HP68.1)

- Roticlear® (Carl Roth, cat. no. A538.1)
- 30% Wasserstoffperoxid-Lösung (H₂O₂; Carl Roth, cat. no. 8070.2)
- Kieselgel-Kugeln (bspw. Carl Roth, cat. no. P077)
- Hämatoxylin-Färbelösung (bspw. Sigma-Aldrich, cat. no. HHS32-1L)
- Hyaluronsäure-Bindeprotein (Sigma-Aldrich, cat. no. H9910-.05MG)
- Diaminobenzidin (DAB, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, cat. no. 34002)
- Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Sigma-Aldrich, cat. no. RABHRP3-600UL)
- Avidin/Biotin-Blockierlösungen (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 004303)

2.2 Verwendete Gerätschaften

- 15 ml Reaktionsgefäße (Falcon-Tube, Corning, Inc., Corning, NY, USA, cat. no.: 352095)
- Zylinder zur Kryoeinbettung von Gewebe (Dosen mit Schnappdeckel, 3 ml, Oehmen Labortechnik, Essen, Deutschland, cat. no.: 9.401820)
- Mikrokryotom (Leica 1850 CM, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
- Superfrost Objektträger (SuperFrost plus, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland, cat. no. 03-0060)
- Kryo-Lagerungsboxen (bspw. Carl Roth, cat. no. TP28.1)
- Dewar-Behälter (bspw. Carl Roth, cat. no. PP15.1)
- Plastikbecher (bspw. Carl Roth, cat. no. C116.1)
- Handpipette 0.5–10 µL (bspw. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland, cat. no. 3120000020)
- Handpipette 20–200 µL (bspw. Eppendorf, cat. no. 3120000054)
- Handpipette 100–1000 µL (bspw. Eppendorf, cat. no. 3120000062) (optional)
- Pipettenspitzen für Handpipetten (bspw. Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland, cat. no. S1111)
- Eppendorf *Safe-Lock* Probenröhrchen, 1.5 mL (Eppendorf, cat. no. 0030120086)
- Feuchte Kammer
- *ImageJ* Software (Version 1.48a, <http://imagej.nih.gov/ij/>)
- *ImageJ cell counter plugin* (<http://imagej.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>)

- Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Axio Imager.M2, Carl Zeiss, cat. no. 490020)
- Mikroskopkamera (Carl Zeiss AxioCam Hrc, cat. no. 426510-9901-000)
- Fluoreszenzleuchte (Carl Zeiss HXP 120 C, cat. no. 423013-9010-000)

2.3 Reagenzienvorbereitung

- 20x phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): 8 g KCL, 8 g KH₂PO₄, 320 g NaCl und 55,2 g Na₂HPO₄ + 2 H₂O, auf 2000 ml Aqua dest. Der ph-Wert wird mittels HCl auf 7,4 eingestellt.
- 10x Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS): 24,2 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 80 g NaCl, auf 1000 ml Aqua dest. Der ph-Wert wird mittels HCl auf 7,6 eingestellt.
- 1x phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): Verdünnen der 20x PBS mit Aqua dest. in einem Verhältnis von 1/20.
- 1x Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS): Verdünnen der 10x TBS mit Aqua dest. in einem Verhältnis von 1/10.
- 3% Wasserstoffperoxid-Lösung (H₂O₂): Verdünnen von 30% H₂O₂-Lösung mit 1x PBS im Verhältnis von 1/10.
- 1% BSA-Lösung: Verdünnen von bovinem Serumalbumin (BSA) in 1x TBS in einem Verhältnis von 1/100 (Gew/Vol).
- Blockierlösung: Verdünnen von fetalem Kälberserum (FCS) mit 1x TBS in einem Verhältnis von 1/10 (Vol/Vol). Hinzufügen von bovinem Serumalbumin (BSA) in einem Verhältnis von 1/100 (Gew/Vol). Diese wurde bei -20 °C gelagert.

2.4 Vorbereitung

Um die im ischämischen Hinterlauf stattgefundene Angiogenese beurteilen und mit dem nicht-ischämischen Hinterlauf vergleichen zu können, erfolgte die immunhistologische Aufarbeitung der Wadenmuskulatur zur Darstellung der Kapillardichte.

Hierzu wurde zunächst in Vorarbeiten durch Herrn Dr. Freudenberger bei oben genannten C57BL/6J Mäusen eine unilaterale Hinterlaufischämie induziert. Um Menstruationszyklus-abhängige Konzentrationsschwankungen von möglicherweiser pro-

oder antiangiogenen Hormonen als Einflussfaktor auszuschließen, wurden ausschließlich männliche Mäuse als Versuchstiere verwendet. Die Tiere wurden innerhalb eines zwölf Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu pathogen-freiem Wasser sowie Standardtrockenfutter. Es fand ein modifiziertes Vorgehen nach Limbourg et al. (2009) Verwendung. Da die in unserem Versuchsaufbau verwendeten C57BL/6J Mäuse *per se* eine gute Erholung nach Ischämie zeigen (Helisch et al., 2006), wurde das beschriebene Verfahren modifiziert, um eine drastischere Ischämie zu induzieren. Dazu erfolgte zusätzlich zu den Ligaturen der Femoralarterie eine Teilexzision der Arterie zwischen den distal gelegenen Ligaturen [Abb. 2.1, Vorgehen publiziert in Driesen et al., (2016)]. Nach diesem Eingriff erfolgte eine 35-tägige Erholungsphase, während welcher durch den Operateur an festgelegten Zeitpunkten der Blutfluss in beiden Hinterläufen mittels *laser doppler perfusion imaging* (LDPI) kontrolliert wurde. Nach 35 Tagen erfolgte dann in einem Finalversuch die Opfierung der Mäusen und Entnahme der Wadenmuskulatur. Die Tierversuche wurden entsprechend den Richtlinien des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen nach § 8 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die beschriebenen Untersuchungen wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung mit dem Aktenzeichen 84-02.04.2012.A292 durchgeführt.

Die Wadenmuskulaturproben wurden in 15% Sucroslösung bei 4 °C über Nacht aufbewahrt, am nächsten Tag in 30% Sucroslösung überführt und eine weitere Nacht bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Präparate in Kryopreservations-Medium (Klinipath BV, Duiven, Niederlande) eingebettet und durch zuvor mittels flüssigem Stickstoff (Linde AG, München, Deutschland) auf -40 °C gekühltem 2-Methylbutan (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) kryofixiert.

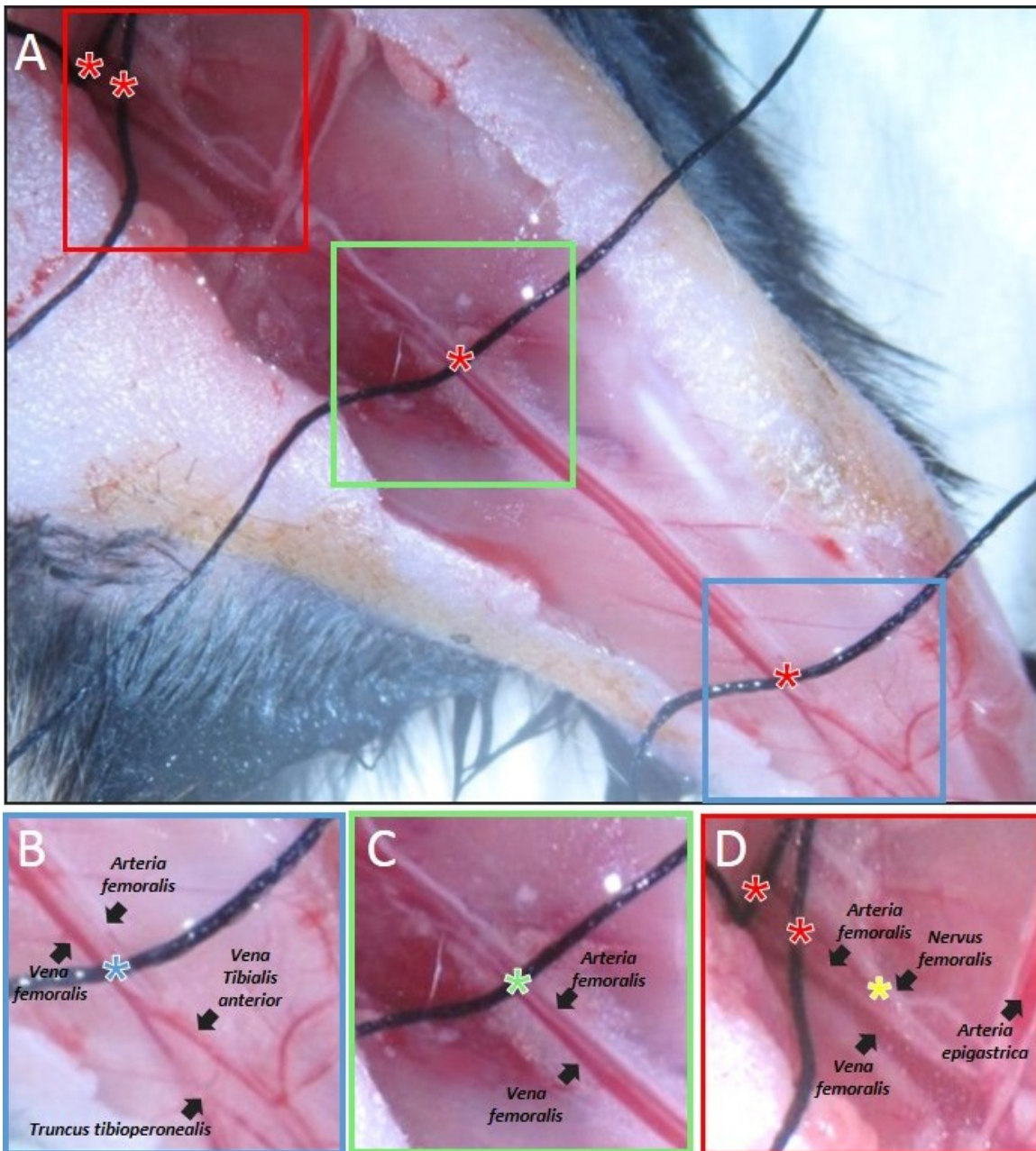


Abb. 2.1: Induktion der Ischämie in Vorarbeiten durch Herrn Dr. Freudemberger. Dargestellt ist der Operationssitus nach Freilegung der *Arteria femoralis* (A). Es wurden vier Ligaturen im Verlauf der Arterie gesetzt (rote Asteriske). Die distalste Ligatur erfolgte dabei knapp proximal der Bifurkation in die anterioren und posterioren Tibialgefäße (B). Eine weitere Ligatur wurde im Verlauf der Arterie auf Höhe eines reproduzierbar auftretenden Fettpolsters vorgenommen (C). Die proximalste Ligatur erfolgte proximal der Anlagerungsstelle des *Nervus femoralis* an die Arterie (gelber Asterisk), um durch die Ligatur sicher auch die *Arteria profunda femoralis* zu erfassen, welche proximal dieser Stelle in der Tiefe vom Hauptgefäß abgeht. Zur Sicherstellung der Induktion einer suffizienten Ischämie erfolgte hier eine doppelte Ligatur sowie eine Exzision der Arterie zwischen den Ligaturen (D). **Abbildung modifiziert nach Driesen et al., (2016).**

Aus den so fixierten Wadenmuskeln wurden nun histologische Schnitte mit einer Dicke von jeweils 10 µm unter Nutzung eines Leica CM1850 Mikrokryotoms (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) bei -20 °C Arbeitstemperatur angefertigt. Die Schnittführung erfolgte hierbei vom proximalen Absetzungsende (in Projektion auf Höhe der Femurkondylen gelegen) zum distalen Ende (entspricht dem Übergang der Wadenmuskulatur in die Achillessehne).

Um möglichst große Vergleichbarkeit zwischen den untersuchten Präparaten und somit später eine reproduzierbare und standartisierte Analyse der Kapillardichte sicherzustellen, wurde Wert auf einen anatomisch-morphologischen Referenzpunkt innerhalb der Wadenmuskulatur gelegt. Trotz einer gewissen morphologischen Variabilität aufgrund der Physiologie des Muskelgewebes fand sich dieser in Form von zwei histologisch gut verfolgbaren Gefäßen (siehe Abb. 2.2). Diese treten im Präparat nicht vor einer Schnittstrecke von mindestens 0,5 cm (ab proximalem Absetzungsende) auf und definieren die erste zur späteren Analyse festgelegte Ebene. Um einen Querschnitt über die Kapillardichte auf verschiedenen Höhen innerhalb der Wadenmuskulatur zu erhalten wurden vier weitere Ebenen zum Anfärben aufgezogen, jeweils im Abstand von 200 µm zueinander (Abb. 2.2).

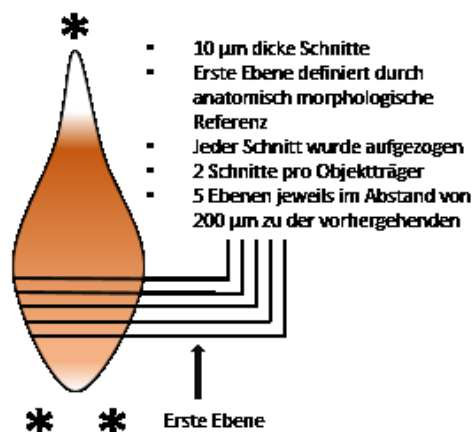


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Schnittführung und des Prozedere. Wadenmuskulatur dargestellt in Richtung der Schnittführung im Mikrokryotom. Die *beiden* Asteriske (**) zeigen dabei das proximale Absetzungsende an und würden sich in Projektion etwa auf Höhe der Femurkondylen befinden. Der alleinstehende Asterisk (*) zeigt das distale Absetzungsende an der Achilles-Sehne an. **Abbildung modifiziert nach Driesen et al., (2016).**

2.5 Immunhistochemische Färbung

2.5.1 Fluoreszenzfärbung von CD31 und α -SMA

Die so gewonnenen Schnitte wurden bei -20 °C gelagert. Anschließend erfolgte das Immunhistologische Anfärben der Schnitte. Um Kapillaren darzustellen und von Arteriolen und Arterien zu unterscheiden, fand das Oberflächenantigen CD31 wie in der Literatur beschrieben als Marker für Kapillarendothel Verwendung (Egami et al., 2006). Das *α -smooth muscle actin* (α SMA) diente als Marker für glatte Muskelzellen, welche die *Tunica media* von Arteriolen und Arterien umfassen (Skalli et al., 1986) .

Um den Einfluss äußerer Störfaktoren zu minimieren, erfolgte das Anfärben aller Präparate einer Ebene der Testgruppen stets in einer Charge nach folgendem Protokoll:

- 1.) Zunächst Auftauen der Präparate bei Raumtemperatur in Lagerbox für zumindest eine Stunde.
- 2.) Fixierung der Gewebeproben in 100% Aceton bei 4 °C für 20 min.
- 3.) Spülen mit 1x PBS bei Raumtemperatur für 5 min. Insgesamt drei Mal.
- 4.) Inkubation in Blockierlösung (siehe Reagenzienzubereitung) für 1 Stunde bei Raumtemperatur zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen.
- 5.) Inkubation der Gewebeproben mit dem Erstantikörper gegen CD31 bei 4 °C über Nacht. Als CD31-Antikörper fand ein *rat anti-mouse* CD31-Antikörper (ab7388, Abcam, Cambridge, UK) Verwendung, in Blockierlösung im Verhältnis 1:100 verdünnt. Auf die jeweiligen Negativkontrollen wurde kein Erstantikörper, sondern lediglich Blockierlösung pipettiert. Die Inkubation fand in einer feuchten Kammer statt.
- 6.) Spülen mit 1x PBS bei Raumtemperatur für 5 min. Insgesamt drei Mal.
Alle folgenden Schritte wurden lichtgeschützt durchgeführt, um die Fluoreszenz der Zweitantikörper nicht zu kompromettieren.
- 7.) Inkubation der Gewebeproben mit dem ersten Zweitantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Als Zweitantikörper wurde *Rhodamin Red X anti-rat*-Antikörper (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, USA) benutzt, in 1x PBS 1:100 verdünnt. Sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen wurden mit Zweitantikörper inkubiert. Die Inkubation fand lichtgeschützt in einer feuchten Kammer statt.

- 8.) Spülen mit 1x PBS bei Raumtemperatur für 5 min. Insgesamt drei Mal.
- 9.) Inkubation der Gewebeproben mit dem Erstantikörper gegen α -SMA für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Als α SMA-Antikörper fand ein *rabbit anti-mouse α -smooth muscle actin*-Antikörper (ab5694, Abcam) Verwendung, in Blockierlösung im Verhältnis 1:100 verdünnt. Auf die jeweiligen Negativkontrollen wurde kein Erstantikörper, sondern lediglich Blockierlösung pipettiert. Die Inkubation fand lichtgeschützt in einer feuchten Kammer statt.
- 10.) Spülen mit 1x PBS bei Raumtemperatur für 5 min. Insgesamt drei Mal.
- 11.) Inkubation der Gewebeproben mit dem zweiten Zweitantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Als Zweitantikörper wurde *goat anti-rabbit Alexa Flour 488*-Antikörper (Life Technologies, Carlsbad, USA) benutzt, in 1x PBS 1:100 verdünnt. Sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen wurden mit Zweitantikörper inkubiert. Die Inkubation fand lichtgeschützt in einer feuchten Kammer statt.
- 12.) Spülen mit 1x PBS bei Raumtemperatur für 5 min. Insgesamt drei Mal.
- 13.) Einbetten der Gewebeproben mit *Roti®-Mount FluorCare DAPI* (Carl Roth, Karlsruhe, DE). Darin enthalten ist eine Kernfärbung mittels 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

2.5.2 DAB-Färbung von Hyaluronsäure

Um zudem analysieren zu können, ob es Unterschiede in dem Gehalt oder der Verteilung von Hyaluronsäure innerhalb der einzelnen Muskelproben zum Zeitpunkt der Kapillardichtenbestimmung gibt, erfolgte desweiteren eine Anfärbung dieser mittels einer Meerettichperoxidase-basierten Diaminobenzidin(DAB)-Färbung nach folgendem Protokoll:

- 1.) Zunächst Auftauen der Präparate bei Raumtemperatur in Lagerbox für zumindest eine Stunde.
- 2.) Fixierung der Gewebeproben in 100% Aceton bei 4 °C für 20 min.
- 3.) Spülen mit 1x PBS bei Raumtemperatur für 5 min. Insgesamt drei Mal.
- 4.) Inkubation der Gewebeproben mit Avidin-Blockierlösung (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für 10 min in feuchter Kammer zur Blockade

- unspezifischer endogener Avidin-Bindungsstellen Anschließend Spülen mit 1x PBS für 5 min.
- 5.) Inkubation der Gewebeproben mit Biotin-Blockierlösung (Thermo Fisher Scientific) für 10 min in feuchter Kammer zur Blockade unspezifischer endogener Biotin-Bindungsstellen. Anschließend Spülen mit 1x PBS für 5 min.
 - 6.) Inkubation in Blockierlösung (siehe Reagenzienvorbereitung) für 1 Stunde bei Raumtemperatur zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen.
 - 7.) Inkubation der Gewebeproben mit dem Bindeprotein für Hyaluronsäure bei 4 °C über Nacht. Als Bindeprotein wurde HA-Bindeprotein (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 1:100 Verdünnung in 1% BSA verwendet. Auf die jeweiligen Negativkontrollen wurde kein Bindeprotein, sondern lediglich 1% BSA-Lösung pipettiert. Die Inkubation fand in einer feuchten Kammer statt.
 - 8.) Spülen mit 1x PBS bei Raumtemperatur für 5 min. Insgesamt drei Mal.
 - 9.) Inkubation in 3% H₂O₂-Lösung (siehe Reagenzienvorbereitung) für 5 min bei Raumtemperatur zur Blockierung möglicher endogener Peroxidaseaktivität.
 - 10.) Spülen mit 1x PBS bei Raumtemperatur für 5 min. Insgesamt drei Mal.
 - 11.) Inkubation der Gewebeproben mit dem Detektionenzym-Komplex für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Verwendet wurde Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Sigma-Aldrich), in 1x PBS 1:200 verdünnt. Sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen wurden mit dem Detektionenzym-Komplex inkubiert. Die Inkubation fand lichtgeschützt in einer feuchten Kammer statt.
 - 12.) Spülen mit 1x PBS bei Raumtemperatur für 5 min. Insgesamt drei Mal.
 - 13.) Spülen mit 1x TBS bei Raumtemperatur für 10 min.
 - 14.) Inkubation mit DAB (Thermo Fisher Scientific) unter mikroskopischer Kontrolle der Detektionsreaktion.
 - 15.) Bei ausreichend Substratumsatz je nach Charge zwischen 2 – 10 min Beenden der Detektionsreaktion durch Überführen der Proben in Aqua dest. für 1 min.
 - 16.) Kernfärbung durch Inkubation in Hämatoxylin-Färbelösung (Sigma-Aldrich) für 1 min. Anschließend kurz Spülen erst mit Leitungswasser, dann mit 1% HCL (Carl Roth, Karlsruhe, DE).
 - 17.) Bläuen unter fließend Leitungswasser für 5 min. Anschließend Spülen in Aqua dest. für 1 min.

18.) Entwässern der Gewebeproben durch Inkubation in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 99,9% Ethanol, Carl Roth) für jeweils 2 min. und Roticlear® (Carl Roth) für 5 min.

19.) Einbetten der Gewebeproben mit Roti®-Mount (Carl Roth).

2.6 Mikroskopie

2.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

Nach dem Trocknen der so angefärbten Schnitte über Nacht erfolgte die Aufnahme von mehreren Gesichtsfeldern je Präparat zur späteren Analyse mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager.M2, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und der entsprechenden Software (AxioVision, Version 4.8.2). Es wurden ein Okular mit 10-facher Vergrößerung sowie ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung (EC Plan-Neofluar 40x/0.75 M27) benutzt, resultierend in Gesichtsfeldern mit 400-facher Vergrößerung. Dies erlaubt eine Analyse auch kleiner Strukturen wie den zu untersuchenden Kapillaren. Als Fluoreszenz-Lichtquelle fand eine HXP 120 C Fluoreszenzlampe (Carl Zeiss) auf Leuchtintensitätsstufe zwei Verwendung. Bei der benutzten Kamera handelte es sich um eine AxioCam Hrc (Carl Zeiss) im „Schwarz-Weiß-Standard“-Betriebsmodus. Da standardisierte Aufnahmebedingungen für verlässliche Ergebnisse in der Fluoreszenz-Mikroskopie unerlässlich sind, wurden über alle Aufnahmen hinweg folgende Belichtungszeiten festgelegt:

1000 ms im Rhodamin-Kanal (Exzitation 540 nm, Emission 580 nm) für CD31-Darstellung

350 ms im FITC-Kanal (Exzitation 498 nm, Emission 516 nm) für α SMA- Darstellung

90 ms im DAPI-Kanal (Exzitation 359 nm, Emission 461 nm) für Kern-Darstellung

2.6.2 Lichtmikroskopie

Zur Auswertung der auf ihren Hyaluronsäuregehalt angefärbten Gewebeproben fand das oben genannte Mikroskop im Durchlichtmodus Verwendung. Als Kamera diente die AxioCam Hrc (Carl Zeiss) im „*standard-color*“-Betriebsmodus. Als Belichtungszeit wurden

345 ms gewählt, bei einer Lampenspannung von 4,78 V. Diese Bedingungen wurden über alle Aufnahmen unverändert beibehalten.

2.6.3 Auswahl der Gesichtsfelder

Die Kapillardichte innerhalb eines Schnittes unterscheidet sich je nach dem, wie nah das mikrokopierte Gesichtsfeld Richtung Haut beziehungsweise Knochen gelegen ist (Driesen et al., 2016). Um einen repräsentativen Durchschnitt über die Kapillardichte der jeweiligen Schnittebene der Gewebeprobe zu bekommen, wurden deshalb neun Gesichtsfelder pro Präparat zur Analyse aufgenommen, welche dem loko-regionalen Unterschied der Kapillardichte Rechnung tragen. Die Auswahl dieser Gesichtsfelder erfolgte standardisiert anhand von anatomisch-morphologischen Landmarken innerhalb der Querschnitte, welche sich über alle Proben hinweg reproduzierbar auffinden ließen (siehe Abb. 2.3).

So wurden folgende Regionen pro Schnitt ausgewählt:

- 1.) **Zwei** Regionen innerhalb des in der Draufsicht links gelegenen äußeren Kompartiment des Muskelquerschnitts (In Abb. 2.2 als 8 und 9 gekennzeichnet). Eine Region liegt dabei nah dem prominenten arteriellen Gefäß dieses Kompartiments (8), die zweite im knochenwärts gelegenen Ende dieses Muskelbauchs (9).
- 2.) **Vier** Regionen im medialen Anteil des Muskels (In Abb. 2.2 als 4 bis 7 gekennzeichnet). Dieser wird durch einen Bindegewebsstrang von einem rechts gelegenen äußeren Muskelanteil getrennt. Desweiteren trennt ein horizontal verlaufender Bindegewebsstrang, welcher zudem ein weiteres prominentes arterielles Gefäß enthält, das mediale Kompartiment in einen hautwärts- sowie einen knochenwärts gelegenen Anteil (siehe Abb. 2.2).
Ein Gesichtsfeld liegt dementsprechend im obersten Teil des hautwärts orientieren Muskelanteils (4), ein weiteres nahe des arteriellen Gefäßes oberhalb der horizontalen Trennlinie (5). Das dritte Gesichtsfeld liegt unterhalb dieser Trennlinie, direkt neben einem über alle Präparate gut sichtbaren Nervenbündel (6). Die vierte Region liegt im unmittelbar knochenwärts orientierten Ende des medialen Muskelbauchs (7).

3.) **Drei** Regionen innerhalb des rechts gelegenen äußeren Muskelkompartiments, welches durch einen vertikal verlaufenden Bindegewebsstrang vom medialen Kompartiment separiert wird. Ein Gesichtsfeld wird hier im hautwärts gelegenen Teil des Muskels gewählt (1), ein weiteres im knochenwärts gelegenen Anteil (3). Die dritte Region liegt dazwischen, in etwa auf Höhe der horizontalen Trennlinie des medialen Kompartiments (2).

Dieses Vorgehen wurde bei jedem Schnitt angewandt, resultierend in insgesamt 45 zu analysierenden Aufnahmen pro Unterschenkel (Neun Aufnahmen pro Ebene bei fünf Ebenen). Analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen wurden die genannten Gesichtsfelder unter Durchlicht-Mikroskopie auch in den für Hyaluronsäure angefärbten Schnitten aufgesucht und fotografiert.

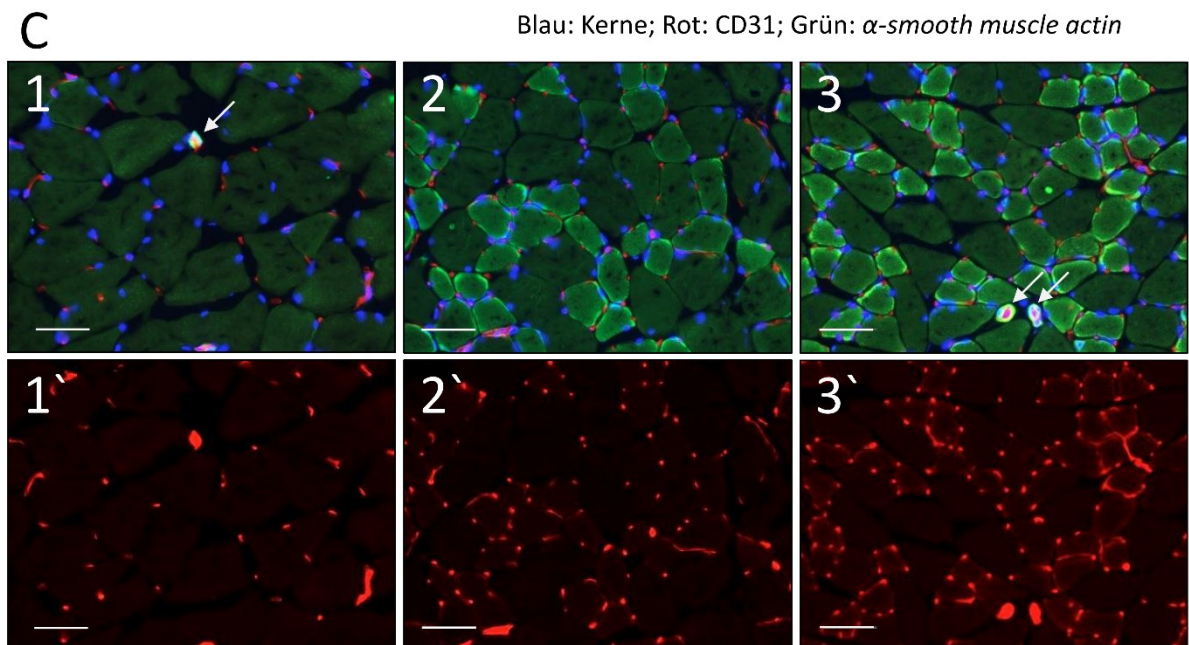
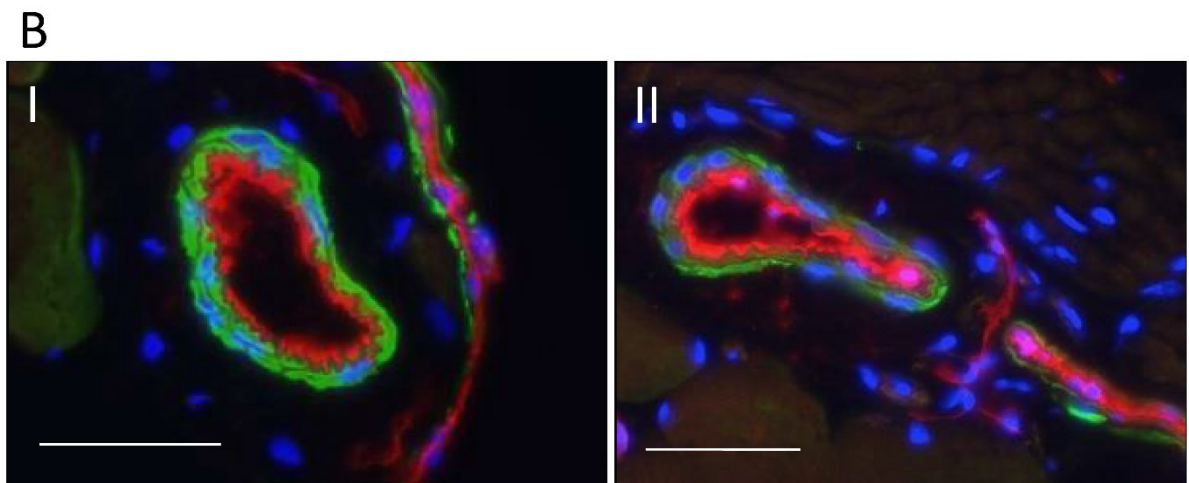
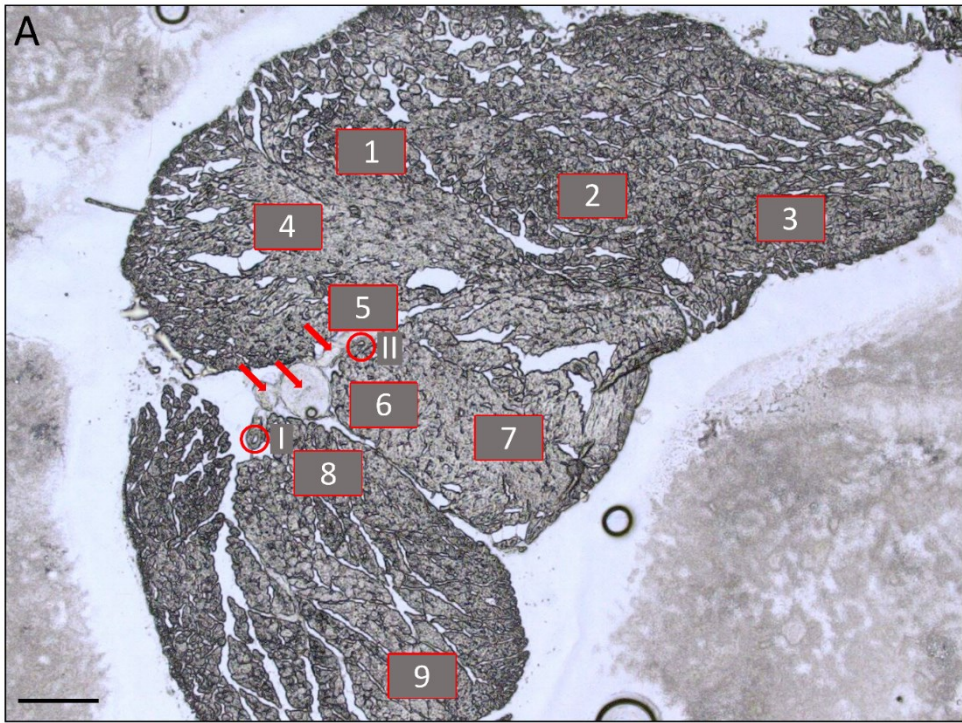


Abb. 2.3: Orientierung innerhalb der histologischen Proben mit anatomisch morphologischen Referenzpunkten und Lokalisation der *regions of interest*. (A) Ungefärbte durchlichtmikroskopische Aufnahme der ersten Ebene mit anatomisch morphologischen Referenzpunkte in Form von zwei kaliberstarken Gefäßen, hier markiert mit roten Kreisen als I und II. Das als II markierte Gefäß zieht dabei zusammen mit Fasern eines Nervenbündels (*rote Pfeile*) innerhalb einer Bindegewebssepte in den medialen, muskelstärkeren Anteil, während das als I markierte Gefäß in den muskelschwächeren Bauch zieht. Zudem sind die im Text beschriebenen *regions of interest* als rote Kästen markiert und von 1 bis 9 durchnummeriert. Der Maßstabsbalken entspricht 500 µm. (B) Fluoreszenzmikroskopische Detailaufnahme der beiden als Leitstrukturen dienenden Gefäße. Man beachte die anhand des deutlichen α SMA-Signals erkennliche ausgeprägte *Tunica media*. Die Maßstabsbalken entsprechen 50 µm. (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der dargestellten Gesichtsfelder 1 bis 3. Gut zu erkennen ist die unterschiedlich starke Kapillarisation in den mehr hautwärts gelegenen Muskelanteilen (Bild 1 und 1') gegenüber den mehr knochenwärts gelegenen Abschnitten (Bild 3 und 3'), die sich über alle Schnitte hinweg findet. CD31-positive Signale werden als Kapillaren gewertet und finden sich typischerweise um Muskelfibrillen herum angeordnet. Signale, welche sowohl für CD31 als auch für α SMA positiv sind (*weiße Pfeile*) wurden als Arteriolen gewertet und von der Analyse ausgeschlossen (siehe Text). Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm. **Abbildung modifiziert nach Driesen et al., (2016).**

2.7 Bestimmung der Kapillardichte

Um die Kapillardichte als Maß für die stattgehabte Angiogenese zu quantifizieren, wurden sowohl die Anzahl an CD31-positiven Signalen als auch der prozentuale Anteil der für CD31 positiv angefärbten Fläche pro Gesichtsfeld analysiert. Dies geschah in den Gewebeproben der ischämischen wie auch der nicht-ischämischen Hinterläufe. Die CD31-positiven Signale wurden sowohl von Hand als auch automatisch gezählt. Um desweiteren Fehlinterpretation durch interstielle Ödembildung oder Muskelschrumpfung vorzubeugen (Irie et al., 2005), wurde zudem die Anzahl an Muskelfibrillen pro Gesichtsfeld gezählt und auf die (handgezählte) Anzahl an CD31-positiven Signalen (als Maßzahl für Kapillaren) bezogen, resultierend in einem „Kapillaren pro Muskelfibrille“-Quotient. Signale, welche sowohl positiv für CD31 als auch für α SMA waren, wurde als Arteriolen gewertet und bei den jeweiligen Kalkulationen der Kapillaranzahl von der Gesamtzahl der CD31-positiven Signale abgezogen. Die gesamte hier beschriebene Analyse der Aufnahmen erfolgte unter Nutzung des Programms *ImageJ* (Version 1.48a).

Zunächst wurde die Aufnahme des Rhodaminkanals (im TIF-Format als verlustfreies Dateiformat) in *ImageJ* geöffnet und zur weiteren Bearbeitung in ein 8-bit Format überführt. Nun wurde ein Schwellenwert festgelegt, der über alle analysierten Aufnahmen hinweg ein repräsentatives Ergebnis der Färbintensität wiedergibt. Dieser lag

bei 18/255 (siehe Abb. 2.4). Die Anzahl an CD31-positiven Signalen und der positiv für CD31 gefärbte Flächenanteil über diesem Schwellenwert wurde anschließend über die „*Analyze particles*“-Funktion ermittelt. Da die Kapillaroberfläche in Mäusen im Bereich von $20 \mu\text{m}^2$ - $30 \mu\text{m}^2$ beschrieben wurde (Seghers et al., 2012) erfolgte die Festlegung von $1 \mu\text{m}^2$ als untere Größenlimitation für als positiv zu wertende Signale. So wurde sichergestellt, dass kleinere CD31-positive Signale korrekt als Artefakt erkannt und ignoriert werden, gleichzeitig aber schräg oder inkomplett angeschnittene Kapillaren noch als solche gezählt werden. Die von der Software als positiv gewerteten Signale wurden anschließend mit der entsprechenden Originalaufnahme abgeglichen, um sicherzugehen, dass unter den festgelegten Parametern eine repräsentative Auswertung erfolgte. Zusätzlich wurden die CD31-positiven Signale jeder Aufnahme manuell gezählt.

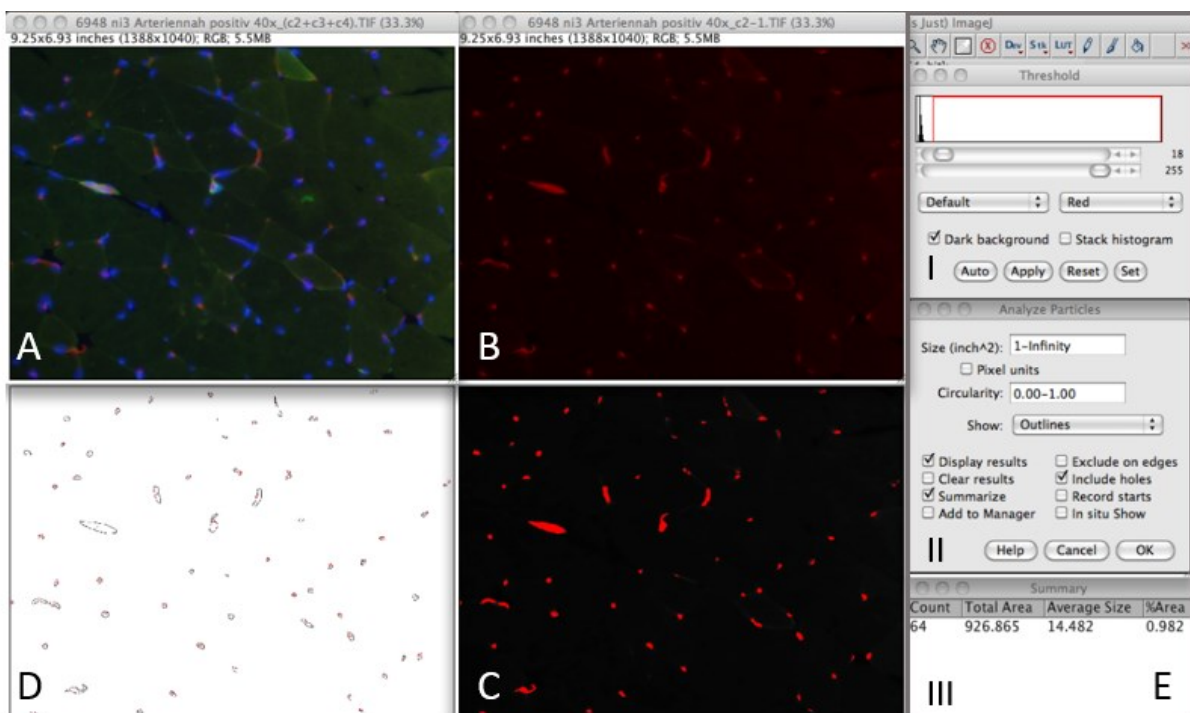


Abb. 2.4: Benutzeroberfläche der zur Auswertung genutzten Software *ImageJ*. Dargestellt sind verschiedene Ansichten des selben fluoreszenzmikroskopischen Gesichtsfeldes. **(A)** Aufnahme aller 3 Bildkanäle zeitgleich dargestellt. **(B)** Nur der Rhodaminkanal der entsprechenden Aufnahme. Diese Aufnahmen stellten die Basis der manuellen Auswertung dar. **(C)** Von *ImageJ* bei dem eingestellten Schwellenwert von 18/255 als CD31-positiv gewertete Signale. **(D)** Von *ImageJ* erzeugte schematische Darstellung der gezählten Signale mit fortlaufender Nummerierung. Diese diente zur Kontrolle, ob die automatisierte Auswertung dem ursprünglichen Bild wie in (B) dargestellt entsprach. **(E)** Fenster der *ImageJ* Benutzeroberfläche, gezeigt sind (I) das Fenster zur Festlegung des Schwellenwertes, (II) das Fenster des zur Zählung verwendeten „*Analyze particles*“-Kommandos sowie (III) die Anzeige der automatisierten Auswertung, inklusive der Anzahl an CD31-positiven Signalen (Count) und des für CD31 positiven Flächenanteils (%Area). **Abbildung modifiziert nach Driesen et al., (2016).**

2.8 Bestimmung des HA-Gehalts

Hierzu wurde zunächst mittels der „*Colour deconvolute*“-Funktion von *ImageJ* der DAB-Farbkanal im jeweiligen zu analysierenden Bild separiert. Das verbleibende Bild wurde dann in ein 8-bit Format überführt. Es erfolgte die Festlegung eines noch als positiv zu wertenden Schwellenwertes für die Färbeintensität. Im Anschluss wurde durch die „*Measure*“-Funktion der für Hyaluronsäure positiv gefärbte Flächenanteil bestimmt.

Da es trotz gleichgehaltener Bedingungen und Reagenzien zu Unterschieden in der Intensität der DAB-Färbereaktion zwischen den als Chargen angefärbten Ebenen kam, konnte kein über alle Ebenen passender Schwellenwert ermittelt werden. Es wurde stattdessen ein für die jeweilige Ebene (ischämische wie nicht-ischämische Präparate) passender Schwellenwert festgelegt. Dieser bewegte sich je nach Intensität der Färbungen in der jeweiligen Ebene zwischen 75/255 und 160/255.

Um einen validen Vergleich zu gewährleisten, wurden auch einen Vergleich der bei unterschiedlichen Schwellenwerten erhobenen Rohdaten verzichtet. Stattdessen wurden zur späteren Auswertung direkt die ebenen-internen Werte des jeweiligen ischämischen Gesichtsfeldes auf die des entsprechenden Gesichtsfeldes im nicht-ischämischen Muskel bezogen. Dies resultierte in einem Quotienten, der jeweils unter gleichem Schwellenwert ermittelt worden ist und zum späteren Vergleich herangezogen wurde.

2.9 Vergleich der Proben

Um nun die Kapillardichte der jeweiligen Muskelproben zu vergleichen, wurde zuerst das arithmetische Mittel der jeweils erhobenen Messwerte Anzahl an Kapillaren (automatisiert und manuell), positiver Flächenanteil und „Kapillaren pro Muskelfibrille“-Quotient innerhalb der neun oben beschriebenen Gesichtsfelder pro Ebene gebildet. Bei fünf ausgewerteten Schnittbildebene pro Muskelprobe resultierte dies in jeweils fünf gemittelten Ergebnissen für die vier Messgrößen pro Muskel. Der jeweilige Mittelwert jeder Messgröße diente dann als Basis zum abschließenden Vergleich der Testgruppen. Nach dem gleichen Verfahren wurden auch die Vergleichsgruppen für den HA-Anteil im Gewebe gebildet.

2.10 Statistik

Zur Testung der Signifikanz zwischen den Gruppen „Has3-KO“ und „Wildtyp“ in Bezug auf den jeweiligen Vergleichsparameter diente der ungepaarte t-Test. Dabei wurden p-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant angenommen. Die Darstellung aller Werte erfolgt \pm Standardfehler (SEM). Sämtliche Signifikanzprüfungen wurden mittels des Programms *GraphPad Prism* in der Version 6.0.1. durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Effekt von Hyaluronsäuresynthase-3-Defizienz im Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie

Vor dem Hintergrund des eingangs beschriebenen Effektes von Hyaluronsäure im Zusammenhang mit Angiogenese sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Veränderung des endogenen Hyaluronsäuresystems, hier in Form eines *Knock-Outs* der Has3, Auswirkungen auf die Angiogenese nach erlittener unilateraler Hinterlaufischämie hat. Als Auswertungsgrundlage hierfür diente das zuvor etablierte und im vorherigen Kapitel beschriebene histologische Verfahren.

3.2 Kapillardichte

3.2.1 Nicht-ischämischer Hinterlauf

Um zu überprüfen, ob es durch das Fehlen einer funktionalen Hyaluronsäuresynthase-3 bei den Has3-KO-Mäusen Unterschiede in der basalen, also physiologischen Gefäßssituation, gegenüber dem Wildtyp gibt, erfolgte zunächst der Vergleich der keiner Ischämie ausgesetzten Hinterläufe (im Folgenden als nicht-ischämisch bezeichnet).

Dabei zeigte sich weder in der automatisierten noch in der manuellen Auswertung ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp (WT) und den Has3-KO-Mäusen (Automatisiert: WT: $71,51 \pm 2,5$ vs. Has3-KO: $73,68 \pm 3,45$ n = 5 – 6, p = 0,62; Manuell: WT: $63,67 \pm 1,89$ vs. Has3-KO: $63,85 \pm 2,98$, n = 5 – 6, p = 0,96).

Auch für die ebenfalls in den nicht-ischämischen Hinterläufen erhobenen Parameter des CD31-positiven Flächenanteils sowie des „Kapillaren pro Muskelfibrillen“-Quotienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Testgruppen (Positiver Flächenanteil: WT: $1,628 \% \pm 0,33 \%$ vs. Has3-KO: $1,782 \% \pm 0,077 \%$, n = 5 – 6, p = 0,69; Kapillaren pro Fibrille: WT: $1,37 \pm 0,03$ vs. Has3-KO: $1,45 \pm 0,04$ n = 5 – 6, p = 0,18).

3.2.2 Ischämischer Hinterlauf

Die durch Ligatur und Teilexzision der *Arteria femoralis* induzierte schwere Ischämie stellt einen erheblichen pro-angiogenen Reiz für die betroffene Extremität dar (Shireman, 2007). Diese Situation stellt somit angelehnt an natürlicherweise auftretende ischämische Prozesse wie etwa im Rahmen der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit einen pathophysiologischen Kontext dar.

In diesem Zusammenhang zeigte sich eine im Vergleich zum Wildtyp bei den Has3-KO-Mäusen signifikant verringerte Kapillardichte in der ischämischen Extremität 35 Tage nach Induktion der Ischämie. Dies gilt sowohl für die automatisierte wie auch für die manuelle Auswertung (Automatisiert: WT: $97,72 \pm 3,75$ vs. Has3-KO: $71,76 \pm 4,56$ n = 5 – 6, p < 0,05; Manuell: WT: $87,62 \pm 3,74$ vs. Has3-KO: $71,76 \pm 4,56$ n = 5 – 6, p < 0,05).

Wie bereits beschrieben erfolgte desweiteren noch die Bildung des Kapillaren-pro-Muskelfibrille-Quotienten, um mögliche Effekte seitens des Interstitiums (etwas durch interstitielle Ödembildung oder Muskeldystrophie) auszuschließen. Auch in diesem Vergleich zeigte sich ein signifikant niedrigerer Wert zu Ungunsten der Has3-KO-Gruppe gegenüber der Wildtyp-Kontrolle (WT: $1,63 \pm 0,05$ vs. Has3-KO: $1,41 \pm 0,02$ n = 5 – 6, p < 0,05).

Um zudem auszuschließen, dass dieser Effekt auf einer veränderten Gefäßstruktur im Sinne von wenigen, aber kaliberstärkeren Kapillaren beruht, wurde zusätzlich der Parameter des für CD31-positiven Flächenanteils erhoben. Dabei zeigte sich gegenüber dem Wildtyp ein im Has3-KO deutlicher Trend zu einer verminderten für CD31 positiv angefärbten Fläche, welcher aber nicht das formulierte Signifikanzniveau erreichte (WT: $2,46 \% \pm 0,34 \%$ vs. Has3-KO: $1,76 \pm 0,16 \%$, n = 5 – 6, p = 0,11). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1 graphisch dargestellt.

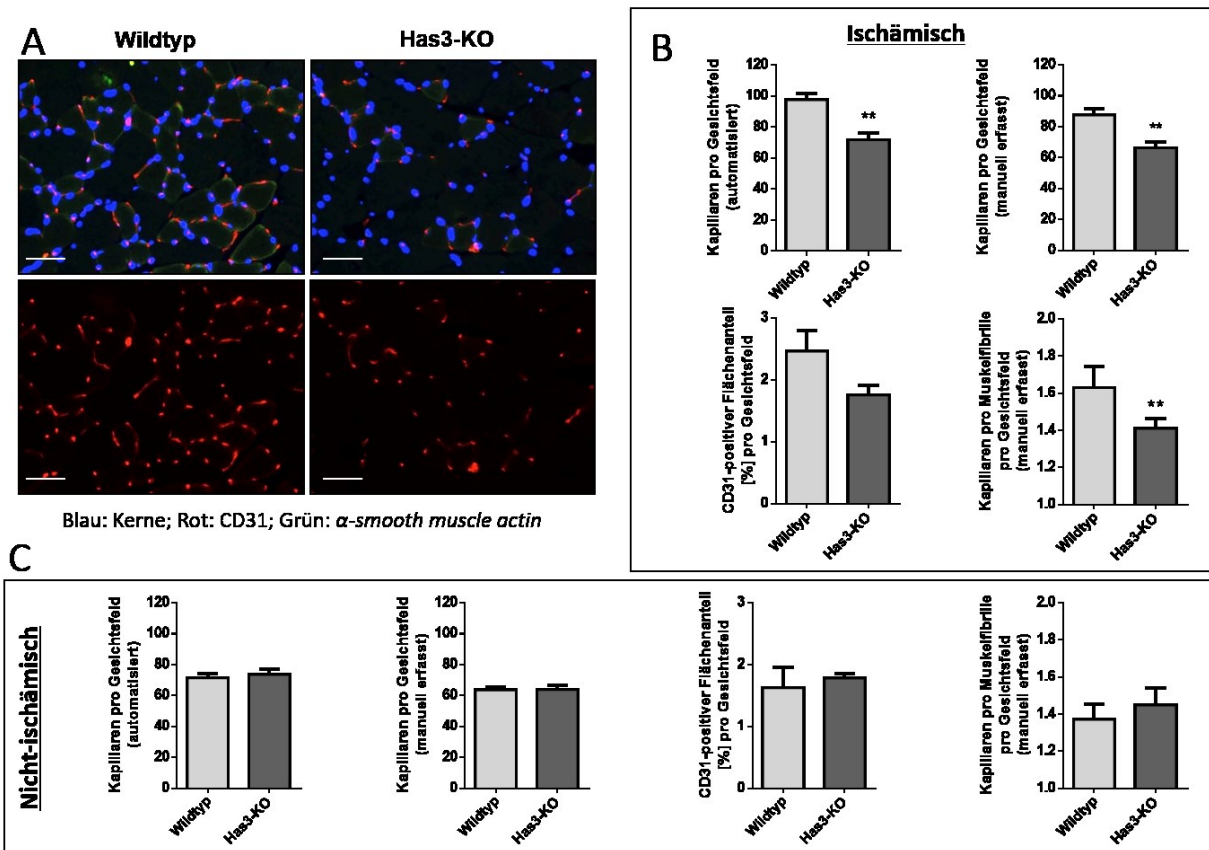


Abb. 3.1: Vergleich der Kapillardichte in Wildtyp und Has3-KO-Mäusen jeweils im von Ischämie betroffenen und nicht betroffenen Hinterlauf. **(A)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Gesichtsfelder aus ischämischen Hinterläufen von Wildtypen und Has3-KO. **(B)** Vergleich des ischämischen Hinterlaufs in Bezug auf Anzahl an Kapillaren, CD31-positivem Flächenanteil und Kapillaren-pro-Muskelfibrille-Quotient pro Gesichtsfeld. **(C)** Vergleich der gleichen Parameter in dem nicht-ischämischen Hinterlauf. $n = 5 - 6$. Der in den Bildern dargestellte Maßstabsbalken entspricht 50 μm . **Eigene Abbildung.**

3.2.3 Testgruppen-interner Vergleich und Ischämisch-zu-Nicht-ischämisch-Quotient

Trägt man die Werte des ischämischen Hinterlaufes gegen jene des nicht-ischämischen Hinterlaufes der jeweiligen Testgruppen auf, so zeigt sich bei den Wildtypen in jedem erhobenen Parameter ein signifikanter Anstieg 35 Tage nach erlittener Ischämie (Kapillaren [automatisiert]: WT [nicht-ischämisch (ni)]: $71,51 \pm 2,50$ vs. WT [ischämisch (i)]: $97,72 \pm 3,75$, $n = 6$, $p < 0,05$; Kapillaren [manuell]: WT [ni]: $63,67 \pm 1,89$ vs. WT [i]: $87,62 \pm 3,74$, $n = 6$, $p < 0,05$; Kapillaren pro Muskelfibrille: WT [ni]: $1,37 \pm 0,03$ vs. WT [i]: $1,63 \pm 0,05$, $n = 6$, $p < 0,05$).

Lediglich in Bezug auf den CD31-positiven Flächenanteil liegt beim Wildtypen zwar ein starker Trend hin zu einer Zunahme im ischämischen Hinterlauf vor, welcher aber nicht das festgelegte Signifikanzniveau erreicht (CD31-positiver Flächenanteil: WT [ni]: $1,63 \% \pm 0,33 \%$ vs. WT [i]: $2,46 \% \pm 0,34 \%$, $n = 6$, $p = 0,11$). Im Verhältnis des CD31-positiven Flächenanteils der ischämischen Extremität gegenüber der nicht-ischämischen Extremität zeigt sich allerdings beim Wildtypen ebenfalls eine signifikante Erhöhung, die im Has3-KO fehlt (*Ischämisch-zu-Nicht-ischämisch-Quotient* [CD31-positiver Flächenanteil]: WT: $2,00 \pm 0,37$ vs. Has3-KO: $1,03 \pm 0,09$, $n = 5 - 6$, $p < 0,05$). Auch bei allen weiteren Parametern blieb in der Gruppe der Has3-KO-Mäuse ein Anstieg als Reaktion auf die Ischämie aus (Kapillaren [automatisiert]: Has3-KO [ni]: $73,68 \pm 3,45$ vs. Has3-KO [i]: $71,76 \pm 4,56$, $n = 5$, $p = 0,75$; Kapillaren [manuell]: Has3-KO [ni]: $63,85 \pm 2,98$ vs. Has3-KO [i]: $66,42 \pm 3,82$, $n = 5$, $p = 0,61$; CD31-positiver Flächenanteil: Has3-KO [ni]: $1,78 \% \pm 0,08 \%$ vs. Has3-KO [i]: $1,76 \% \pm 0,16 \%$, $n = 5$, $p = 0,89$; Kapillaren pro Muskelfibrille: Has3-KO [ni]: $1,45 \pm 0,04$ vs. Has3-KO [i]: $1,41 \pm 0,02$, $n = 5$, $p = 0,45$). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.2 graphisch dargestellt.

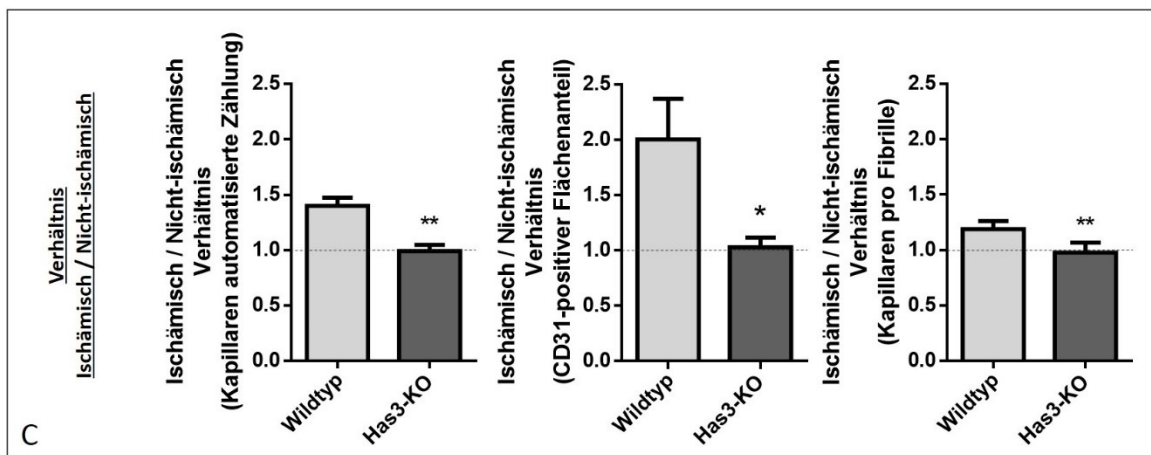
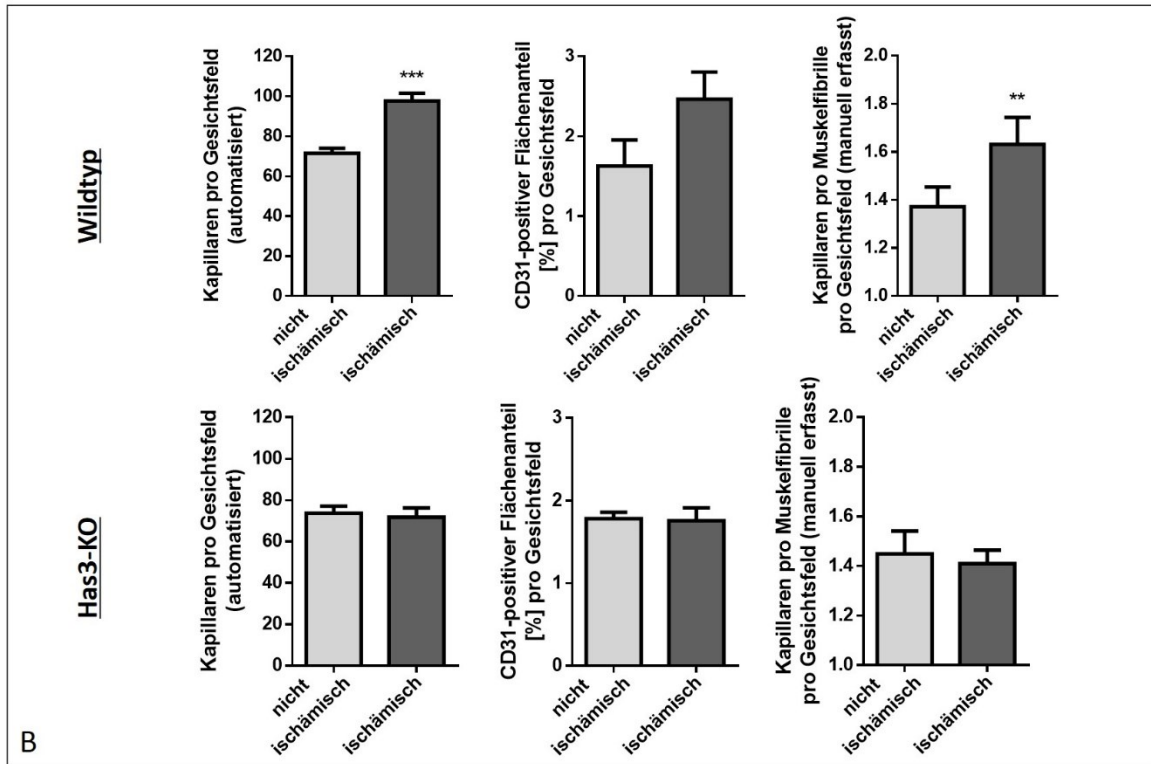
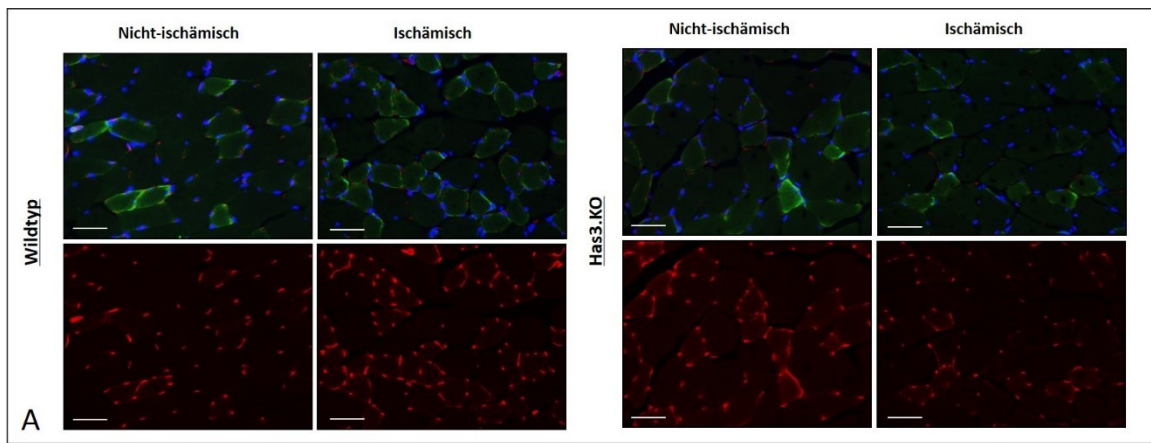


Abb. 3.2: Vergleich der Kapillardichte im ischämischen Hinterlauf gegenüber dem nicht-ischämischen in Wildtyp und Has3-KO. (A) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Gesichtsfelder von Wildtypen und Has3-KO. **(B)** Vergleich des nicht-ischämischen Hinterlaufs gegenüber dem ischämischen in Bezug auf Anzahl an Kapillaren, CD31-positivem Flächenanteil und Kapillaren-pro-Muskelfibrille-Quotient pro Gesichtsfeld in beiden Testgruppen. Vergleich des Quotienten der Kapillaren und CD31-positiven Flächenanteils sowie Kapillaren pro Muskelfibrille des ischämischen gegenüber des nicht-ischämischen Hinterlaufs in Wildtyp und Has3-KO. n = 5 - 6. Der in den Bildern dargestellte Maßstabsbalken entspricht 50 μ m. **Eigene Abbildung.**

3.3 Hyaluronsäuregehalt im Gewebe

Um zu überprüfen, ob sich simultan zu den ablaufenden angiogenen Prozessen 35 Tage nach induzierter Ischämie eine Veränderung des Gehaltes an Hyaluronsäure (HA) im Gewebe zeigt, wurde die entnommene Wadenmuskulatur ebenfalls auf diesen Parameter hin untersucht. Dazu wurde jeweils der positiv für Hyaluronsäure angefärbte Flächenanteil pro Gesichtsfeld im nicht-ischämischen und ischämischen Muskel bestimmt. Anschließend wurde der ischämische auf den nicht-ischämischen Wert des jeweiligen Gesichtsfeldes bezogen, resultierend in einem *Ischämisch-zu-Nicht-ischämisch-Quotienten*. Dieser wurde analog zu dem Vorgehen bei der Kapillarzählung zunächst pro Ebene gemittelt, resultierend in fünf Werten pro Muskelprobe. Aus diesen wurde wiederum der Mittelwert gebildet. Dieser so gemittelte Quotient diente dann als Vergleichswert für die Testgruppen. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und dem Has3-KO (WT: 1,50 % ± 0,25 % vs. Has3-KO: 1,06 % ± 0,20 %, n = 5 - 6, p = 0,21).

Desweiteren zeigte sich zum beobachteten Zeitpunkt 35 Tage nach dem Eingriff keine auffälligen Verteilungsmuster der Hyaluronsäure. HA-Akkumulationen an bindegewebsreichen Strukturen wie etwas Gefäß-Nerven-Scheiden zeigten sich gleichermaßen in beiden Testgruppen. Siehe hierzu auch Abb. 3.3.

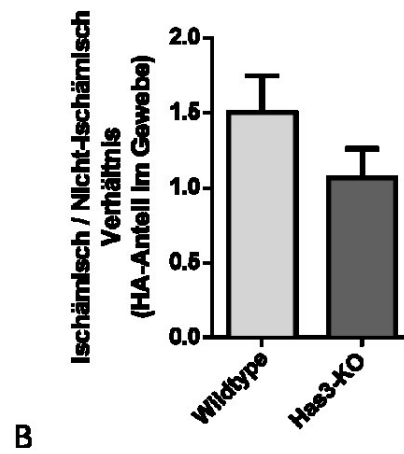
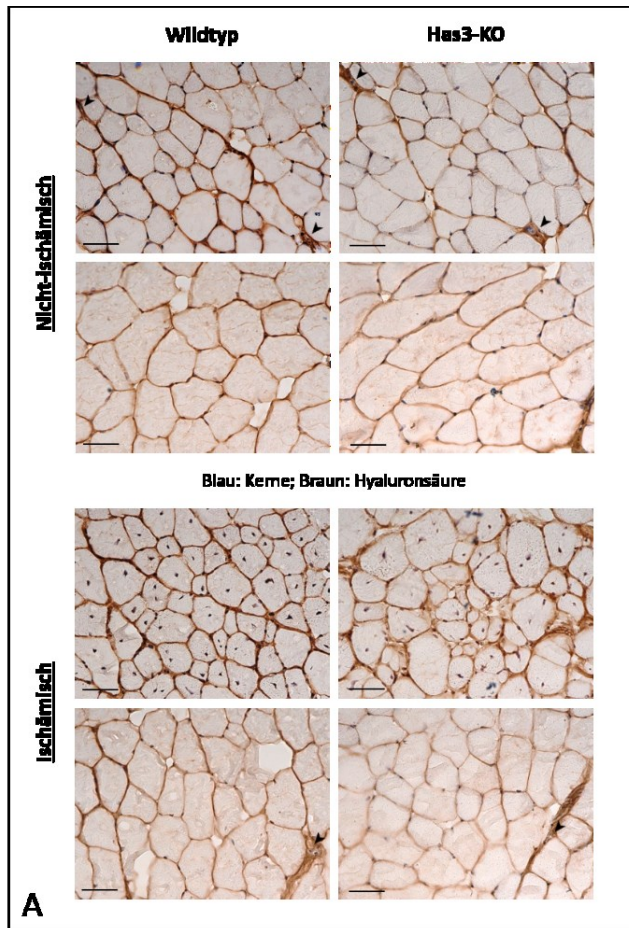


Abb. 3.3: Vergleich des interstiellen Hyaluronsäure-Gehaltes und dessen Verteilung. (A) Repräsentative durchlichtmikroskopische Gesichtsfelder aus nicht-ischämischem und ischämischem Hinterläufen von Wildtypen und Has3-KO-Mäusen. Man beachte, dass sich unabhängig vom HA-Gehalt des Gewebes keine Unterschiede bezüglich des Verteilungsmusters ergeben. Pfeilköpfe = Beispiele für HA-Akkumulation im begleitenden Bindegewebe kaliberstärkerer Gefäße. **(B)** Vergleich der Auswertung des für HA-positiv gefärbten Flächenanteils. Es wurde jeweils der Wert des ischämischen Gesichtsfeldes auf den des entsprechenden nicht-ischämischen bezogen, um so den Ischämisch-zu-Nicht-ischämisch-Quotienten zu bilden. $n = 5 - 6$. Der in den Bildern dargestellte Maßstabsbalken entspricht $50 \mu\text{m}$. **Eigene Abbildung.**

4. Diskussion

4.1 Die verwendeten Antikörper

Die Hyaluronsäuresynthase-3 defizienten Mäuse zeigten eine signifikant niedrigere Anzahl an CD31 positiven Signalen in dem ischämischen Hinterlauf als die entsprechenden Wildtypkontrollen. Zwar ist der zur Markierung von Endothelzellen gewählte Marker CD31, teils auch als *platelet endothelial cell adhesion molecule 1* oder PECAM1 bezeichnet, nicht ausschließlich endothelzellspezifisch, sondern findet sich beispielsweise auch auf Leukozyten oder hämatopoetischen Stammzellen (Cheung et al., 2015). Allerdings ist die Verwendung von CD31 als Kapillarmarker in der Literatur weit verbreitet (Jiang et al., 2016). Es ließ sich zwar in den untersuchten Präparaten nur vereinzelt ein Gefäßlumen darstellen, das Verteilungsmuster der CD31-positiven Signale entspricht allerdings in allen untersuchten mikroskopischen Schnitten mit einer perifibrillären Anordnung der zu erwartenden histologischen Morphologie eines Kapillarsystems. Desweiteren liegt die Größe der Signale im Bereich des von Kapillaren zu erwartenden Durchmessers (Troprès et al., 2004). Die zudem reproduzierbar auftretende doppelte Anfärbbarkeit für CD31 und α SMA bei flächenmäßig größeren CD31-positiven Signalen und das nicht Vorhandensein alleiniger α SMA-positiver Signale spricht weiter für eine endothelspezifische Anfärbung von CD31, zumindest im Fall der untersuchten mikroskopischen Präparate. Somit ist in dieser Arbeit die Bezeichnung „Kapillare“ mit einem alleinigen für CD31-positiven Signal gleichgesetzt.

α SMA zeichnet sich durch sein überwiegend spezifisches Auftreten in der glatten Gefäßmuskulatur aus, auch wenn vereinzelt nicht-muskuläre Zellen mit Expression von α SMA beschrieben sind, wie etwa die im Rahmen von Wundheilung auftretenden Myofibroblasten (Wang et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit zeigten sich allerdings nur vereinzelt perifibrilläre α SMA-positive Signale, während die Gefäßmuskulatur großer Gefäße kräftig zur Darstellung kam. Zum Auftreten von alleinigen für α SMA, nicht aber CD31 positiver Signale kam es nicht. Wie zuvor beschrieben, wurden sowohl für CD31 als auch für α SMA positive Signale als Arteriolen gewertet und in der Auswertung von der jeweilig ermittelten Kapillanzahl subtrahiert. Insgesamt traten auch diese doppelt positiven Signale in der Auswertung allerdings nur vereinzelt auf und zeigten keine signifikante Häufung in einer der Testgruppen.

4.2 Der Has3-Knock-Out-Phänotyp

Wie oben beschrieben wird in den verwendeten Has3-*Knock-Out*-Mäusen bereits in der Embryonalentwicklung keine funktionale Has3 gebildet. Im Gegensatz zu Has2-*Knock-Out*-Mäusen, welche bei einem vollständigen Fehlen der Has2 aufgrund einer unzureichenden Entwicklung des embryonalen Herzkissens in der Embryonalentwicklung versterben (Camenisch et al., 2000), sind Has3-KO-Embryos dennoch überlebensfähig.

Anders als bei den embryonalen Has2-KO-Mäusen, welche außer dem Versterben auch andere Pathologien wie etwa eine unzureichende Entwicklung der Wirbelsäule zeigen (Roughley et al., 2011), ist zudem kein klarer pathologischer Phänotyp im Zusammenhang mit einem embryonalen Has3-*Knock-Out* beschrieben.

In der Literatur finden sich Angaben über eine erhöhte Resistenz gegenüber beatmungsassoziierten Lungenschäden sowie eine erhöhte Anfälligkeit für epileptische Anfälle bei Has3-defizienten Mäusen (Triggs-Raine & Natowicz, 2015). In Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen gibt es keine Beschreibungen von Auffälligkeiten der gesunden Has3-KO-Mäuse. Im pathophysiologischen Stenose-Modell der *Arteria carotis* Ligatur zeigen diese Tiere allerdings eine verminderte Hyperplasie der Neointima im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (Kiene et al., 2016). Auch zeigen kombinierte Has1- und Has3-KO Mäuse eine verminderte postinflammatorische Lymphangiogenese der Kornea (Sun et al., 2019).

Passend zu der dargestellten Studienlage zeigte sich bei den Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein Unterschied im nicht-ischämischen Hinterlauf zwischen den verwendeten Has3-KO-Mäusen und den WT-Kontrollen.

4.3 Die endogene HA-Synthese im Kontext von vaskulären Pathologien

4.3.1 Atherosklerose

Das ist in dieser Arbeit verwendete Mausmodell der Hinterlaufischämie induziert eine kritische Ischämie der betroffenen Extremität. Zwar handelt es sich bei der durch Ligatur und Exzision der *Arteria femoralis* induzierten Ischämie um ein akutes Krankheitsbild, durch die hohe Kapillariserungsrate und dem daraus resultierende Erholungspotential zeigen die hier verwendeten C57BL/6J-Mäuse ein Krankheitsbild, wie es beim Menschen nur bei einem chronischen Verlauf zu erwarten wäre.

Dieser chronische Verlauf beim Menschen basiert auf einem sukzessiven Verschluss des Gefäßlumens im Rahmen von fortschreitender Atherosklerose. Wie eingangs dargestellt, ist das Krankheitsbild der Atherosklerose durch zwei Pathomechanismen wesentlich geprägt. Einerseits durch die Ablagerung von Lipiden an der Gefäßwand sowie durch die Unterhaltung eines inflammatorischen Prozesses innerhalb dieser Ablagerungen andererseits. HA spielt im Kontext dieser beiden Prozesse jeweils eine Rolle (Fischer, 2019). So ist HA zunächst als Bestandteil der EZM, beziehungsweise insbesondere der intakten Glykokalix, ein protektiver Faktor gegenüber frühen Endothelschäden, welche eine Lipidanlagerungen und Entstehung atherosklerotischer Plaques begünstigen. Nach Inhibition der HA-Synthese mittels 4-Methylumbelliferon (4-MU) im Mausmodell ist eine verstärkte Plaquebildung durch Degradation der Glykokalix beschrieben (Nagy et al., 2010). Ist es andererseits bereits zur Entstehung von Plaques gekommen, zeigt sich besonders in instabilen Läsionen mit Gefahr einer vaskulären Komplikation eine hohe Konzentration von HA (Kolodgie et al., 2002). Auch in sekundären Plaques, die nach Manipulation im Gefäßlumen, wie etwa durch Implantation eines intraluminalen Stents oder eine Ballon-Angioplastie entstehen, findet sich eine hohe Konzentration von HA (Wight, 2008). Innerhalb dieser HA-reichen Plaques findet sich eine verstärkte Aktivierung von pro-inflammatorischen Makrophagen. In *Has3-Knock-Out*-Mäusen zeigt sich eine deutlich verminderte Ausprägung dieser Makrophagen-vermittelten Inflammation und daraus resultierend eine verringerte Größe der atherosklerotischen Plaques (Homann et al., 2018).

HA kommt also nicht bloß als Matrixbestandteil eine Rolle im Zusammenhang mit vaskulären Erkrankungen zu, sie zeigt sich auch in ihrer Funktion als Mediator von Entzündungsreaktionen als Effektor. Die von Homann et al. gezeigte verstärkte Entzündungsreaktion und daraus resultierende vaskuläre Pathogenität in Abwesenheit von Has3 lässt sich am ehesten auf eine verstärkte Polarisierung der T-Zellen hin zu einer pro-inflammatorischen Zellpopulation zurückführen (Buono et al., 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fand keine dezidierte Analyse der Proben in Hinblick auf Entzündungsreaktion in der Muskulatur statt. Da die Proben 35 nach Induktion der Ischämie untersucht wurden, ist es zudem wahrscheinlich, dass sich eine lokale Entzündungsreaktion bereits in der Frühphase der Ischämie ereignet hat. In den untersuchten Proben zeigten sich zumindest keine typischen mikroskopischen Aspekte einer anhaltenden Entzündungsreaktion wie etwa Ödembildung oder verstärkte Einwanderungen von Zellen in das Muskelgewebe. Zudem handelt es bei der im Rahmen der vorliegenden Arbeit induzierten Ischämie zwar ebenfalls um ein akut induziertes vaskuläres Krankheitsbild im Sinne eines Muskelfarktes, das benutzte Mausmodell stellt dabei aber aufgrund der guten Erholung der verwendeten Mäuse nach akut induzierter Ischämie im pathophysiologischen Kontext eher ein Modell für Angiogenese im Sinne einer chronischen Extremitätenischämie dar. Nichts desto minder spielen inflammatorische Prozesse auch im Zusammenhang der kritischen Extremitätenischämie eine Rolle (Shireman, 2007).

Die Has3-defizienten Mäuse zeigten in der vorliegenden Arbeit eine verringerte Erholung nach erlittener Ischämie gegenüber den Wildtyp-Kontrollen. Daher stellt sich die Frage, ob es im vorliegenden Modell durch die Has3-Defizienz ebenfalls zu einer vom Wildtyp abweichenden Veränderung der Entzündungsreaktion kommt. Zudem wirkt sich in der vorliegenden Arbeit das Fehlen einer funktionierenden Has3 negativ auf die postischämische Angiogenese der Skelettmuskulatur aus. Dies führt wiederum zu der Frage, ob eine Modulation von inflammatorischen Prozessen durch die Has3 im Angiogenesemodell einen anderen Effekt zeigt als im Stenosenmodell. Insgesamt stellt ein möglicherweise von dem Effekt im Zusammenhang mit atherosklerotischer Plaquebildung abweichender Einfluss einer Has3 vermittelten T-Zell- oder Makrophagen-Polarisierung im Kontext der Angiogenese daher eine interessante, aktuell noch offene Fragestellung dar.

4.3.2. Ischämie

Die Rolle von exogen zugeführter HA im Kontext von ischämischen Krankheitsbildern ist über die letzten Jahrzehnte von verschiedenen Autoren untersucht und beschrieben worden [West et al., (1985); Lees et al., (1995); Toole et al., (2002); Gao et al., (2010); Wang et al., (2019)]. Mit der Entdeckung und Beschreibung der HA-Synthasen um die Jahrtausendwende (Itano et al., 1999) ergab sich dabei ein neuer Aspekt in der Forschung zur Angiogenese, welcher bis heute nicht abschließend beleuchtet ist.

So zeigte sich zunächst im Zusammenhang mit Tumormodellen ein Einfluss der endogenen HA-Synthese auf angiogene Prozesse, etwa in Form von vermehrter Angiogenese in Prostatakarzinom-Zellen nach HAS3-Überexpression (Liu et al., 2001). Auch bei anderen Tumorentitäten wie Blasen- oder Mammakarzinomen ist eine erhöhte HA-Konzentration im Tumorgewebe mit vermehrter Invasivität und Tumorangiogenese assoziiert (Stern, 2005).

Insgesamt deutlich weniger umfangreich ist die Rolle im der endogenen HA-Synthese im Kontext mit Angiogenese bei nicht-malignem Gewebe beschrieben. Im Mausmodell kommt es nach induzierter Lungenischämie sowohl zu einer Induktion von Has1 und -2, als auch zu einem erhöhten Auftreten von niedermolekularen HA-Fragmenten (Eldridge et al., 2011). In besagter Studie zeigte sich zudem eine HA-assoziierte erhöhte Angiogenese im ischämischen Lungengewebe, allerdings nach endotrachealer Zufuhr von exogenen HA-Fragmenten. Auch im Falle einer beschriebene erhöhte Kapillardichte im Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie in Zusammenhang mit einer Kombination von HA und humanen Nabelvenen-Endothelzellen im Vergleich zur alleinigen Gabe von besagten Endothelzellen erfolgte die HA-Zufuhr über die Gabe von exogenen Fragmenten (Tang et al., 2011). Eine wesentliche Beobachtung in Bezug auf einen rein endogenen Effekt stellt die Arbeit von Wang et al. (2020) dar. Hier erfolgten ein konditionaler *Knock-Out* der endothelialen Has2 sowie anschließend die Induktion einer unilateralen Hinterlaufischämie bei Mäusen. Die *Has2-Knock-Outs* zeigten dabei eine deutlich schlechtere Reperfusion als WT-Kontrollen, bis hin zum Verlust der Extremität. Interessanterweise zeigte sich in der mikroskopischen Untersuchung der Wadenmuskulatur bei den *Has2-KO*-Mäusen eine erhöhte Kapillardichte (Wang et al., 2020)

4.4 Effekt der Has3-Defizienz auf die Angiogenese nach induzierter unilateraler Hinterlaufischämie

4.4.1 Nicht-invasiver Vergleich der Hinterlaufperfusion in Vorarbeiten

In Vorarbeiten durch Herr Dr. Till Freudenberger erfolgte eine Perfusionsmessung der Hinterläufe von Has3-*Knock-Out*-Mäusen und entsprechenden Wildtypkontrollen mittels *laser doppler perfusion imaging* (LDPI) nach unilateraler Hinterlaufischämie. Die dabei verwendeten Mäuse wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten wie die Versuchstiere in dieser Arbeit, die Induktion der Hinterlaufischämie erfolgte durch Herrn Dr. Freudenberger nach demselben modifizierten Protokoll nach Limbourg (2009) wie in dieser Arbeit beschrieben. LDPI-Messungen stellen ein gut etabliertes Verfahren zur Bestimmungen von lokalen Blutflüssen dar und finden in der Literatur vielfach Verwendung (Lindén et al., 1995). Im Zusammenhang mit dem Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie zeigt sich beispielweise eine verminderte Hinterlaufperfusion in der LDPI nach einem *Knock-Out* der Hämoxxygenase (HO)-1 (Jazwa et al., 2013) oder bei Mäusen mit Heparinsulfat-defizientem Perlecan (Qiang et al., 2014).

Bei den von Herr Dr. Freudenberger durchgeführten Messungen zeigte sich bereits eine Minderung beziehungsweise ein deutlicher Trend hin zu einer Minderung des Blutstroms im ischämischen Hinterlauf der Has3-KO Mäuse, wie in Abb. 4.1 und 4.2 dargestellt.

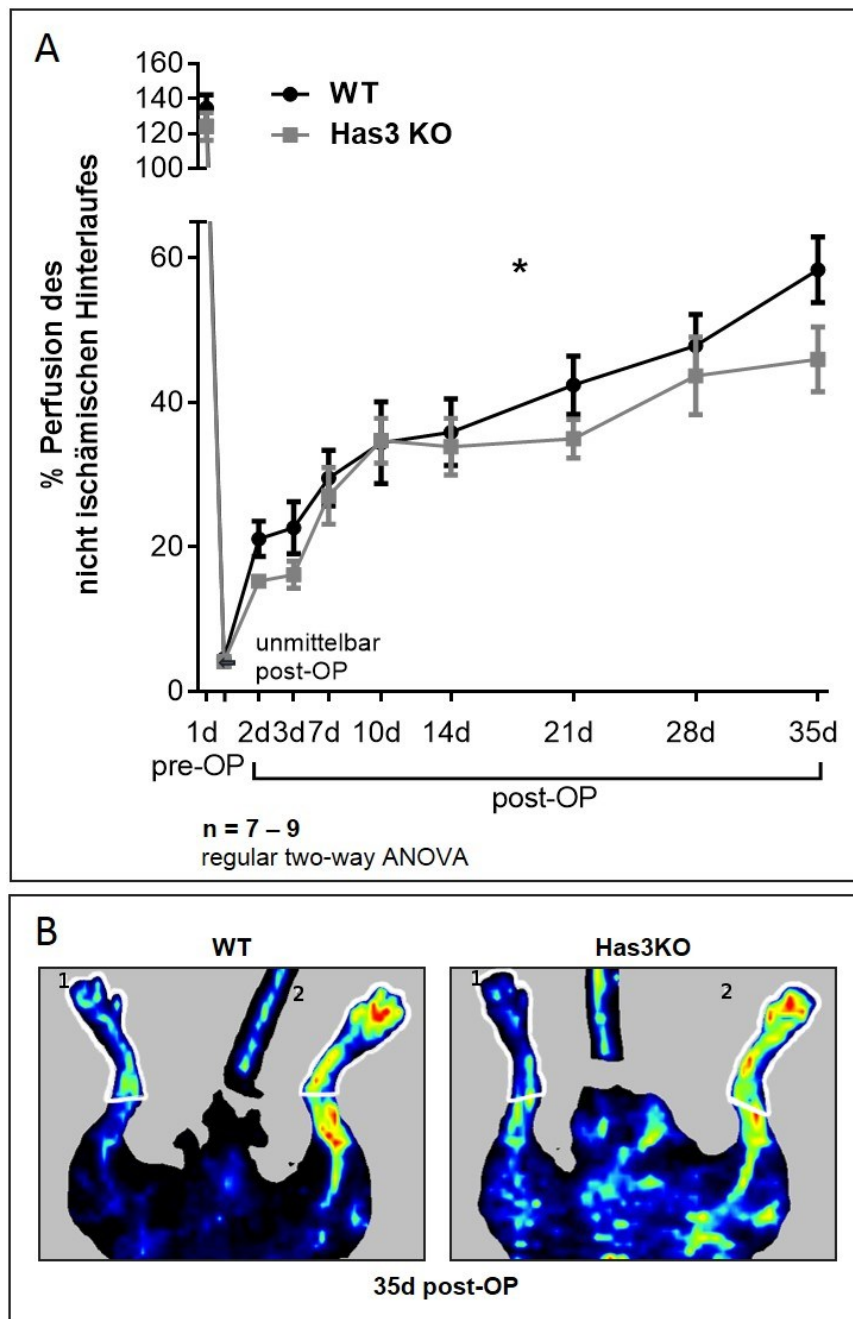


Abb. 4.1: Bestimmung des Blutstroms nach induzierter unilateraler Hinterlaufischämie mittels LDPI. (A) Es wurde jeweils in beiden Testgruppen zunächst der Blutstrom im nicht ischämischen Hinterlauf gemessen und anschließend der des ischämischen Hinterlaufs darauf bezogen. Die so ermittelte prozentuale Perfusion im Vergleich zum jeweiligen nicht-ischämischen Hinterlauf wurden dann zwischen den Testgruppen verglichen **(B)** Repräsentative Darstellung der Perfusionsmessung. Der jeweils gemessene Bereich des ischämischen (1) sowie nicht-ischämischen Hinterlaufs (2) unterhalb des Knies ist mit einer weißen Umrandung markiert. Die Messung erfolgte in Bauchlage, bei dem ischämischen Hinterlauf handelt es sich stets um den rechten Hinterlauf des Tiers. $n = 7 - 9$. Statistischer Vergleich mittels *regular two-way ANOVA*. **Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. J. Fischer, Direktor des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf. Daten erhoben von Dr. T. Freudenberger & Dr. R. Schneckmann, publiziert in Schneckmann, (2018).**

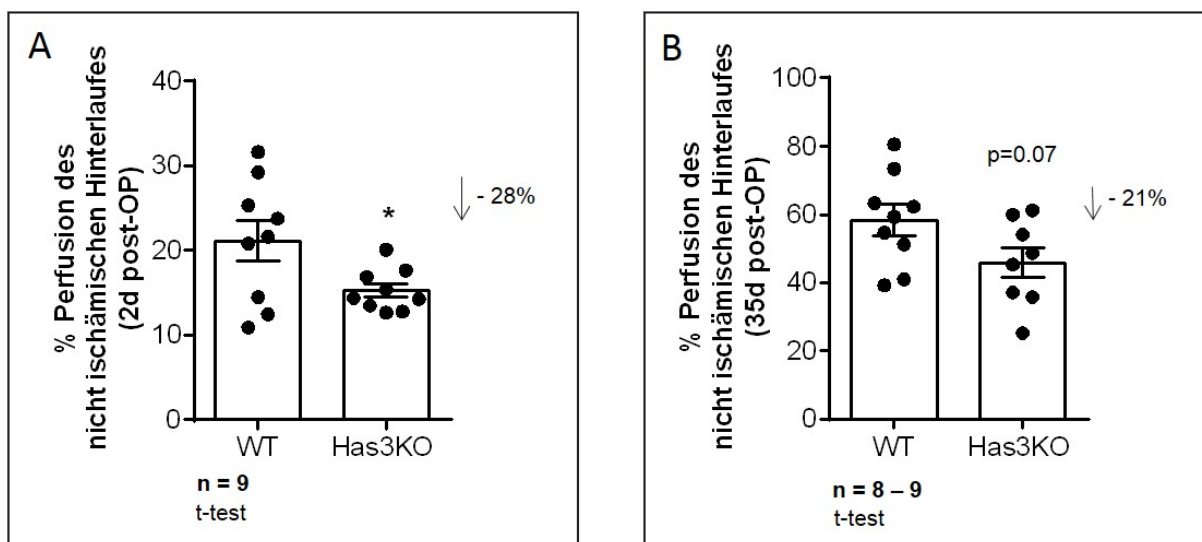


Abb. 4.2: Vergleich der Hinterlaufperfusion zwischen WT und Has3-KO. (A) An Tag zwei nach Induktion der unilateralen Hinterlaufischämie zeigt sich eine signifikant niedrigere Perfusion im ischämischen Hinterlauf der Has3-Knock-Outs. **(B)** An Tag 35 zeigt sich zwar weiterhin ein deutlicher Trend hin zu einer schlechteren Perfusion der Has3-KO, hier wird das festgelegte Signifikanzniveau von einem p-Wert < 0,05 allerdings nicht erreicht. n = 8 – 9. Statistischer Vergleich mittels *unpaired student t-test*. **Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. J. Fischer, Direktor des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf. Daten erhoben von Dr. T. Freudenberger & Dr. R. Schneckmann, publiziert in Schneckmann, (2018).**

4.4.2 Histologischer Vergleich

Der Zeitpunkt der letzten LDPI-Messung (Tag 35 nach Induktion der Ischämie) entspricht auch dem Zeitpunkt, an welchem die in dieser Arbeit verwendeten Muskelproben entnommen wurden. Die dann an diesen Muskelproben durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen zeigten zwei Dinge:

1. Es findet sich kein Unterschied in der basalen Kapillardichte zwischen den Has3-Knock-Outs und den WT-Kontrollen. Für eine grundlegende Störung der Vaskulogenese im Rahmen der embryonalen oder postnatalen Entwicklung ergibt sich also aus der vorliegenden Arbeit kein Anhalt. Dies deckt sich mit der bereits dargestellten Studien zum im basalen physiologischen Zustand unauffälligen Has3-KO-Phänotyp.
2. Nach Induktion einer relevanten Ischämie im Hinterlauf kommt es bei den Has3-KO-Mäusen nicht zu einem Anstieg der Kapillardichte als Reaktion auf den

ischämischen Reiz. Während die Wildtyp-Mäuse eine etwa um ein Drittel erhöhte Kapillardichte in dem ischämischen Hinterlauf gegenüber dem nicht-ischämischen Hinterlauf zeigten, blieb dieser Anstieg bei den Has3-KO-Tieren vollständig aus. Dies passt zum in Vorarbeiten durch Herr Dr. Freudenberger am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikum Düsseldorf festgestellten Trend hin zu einer Minderperfusion des ischämischen Hinterlaufs der Has3-*Knock-Outs* im Vergleich zum Wildtyp in der LDPI-Messung.

In Bezug auf die eingangs formulierte Fragestellung, ob es einen Unterschied zwischen WT- und Has3-KO-Mäusen hinsichtlich der Kapillariserungsrate nach unilateraler Hinterlaufischämie gibt, lässt sich daher anhand dieser Arbeit zeigen, dass der durch die Ischämie ausgelöste Anstieg der Kapillarbildung in der Hinterlaufmuskulatur bei den Has3-KO-Tieren ausbleibt. Somit lässt sich vermuten, dass es einen Effekt der endogenen HA-Synthese auf Angiogenese im pathophysiologischen Kontext der kritischen Extremitätenischämie gibt.

4.5 Mögliche Mechanismen

Über die dem zugrunde liegenden Mechanismen kann anhand der vorliegenden Arbeit keine Aussage getroffen werden. Wie eingangs dargestellt, zeigen sich im Falle von exogen zugeführter HA dann pro-angiogene Effekte, wenn es sich um kurzkettige Oligosaccharide handelt (West et al., 1985). Obwohl gezeigt wurde, dass alle HAS-Isoformen langkettige HA produzieren können, wird die Has3-Isoform, welche den in dieser Arbeit verwendeten Mäusen in einer nicht funktionellen Form vorlag, in der Literatur wiederholt mit der Produktion von vorwiegend kürzerkettigen HA-Fragmenten in Verbindung gebracht (Bai et al., 2005). Auch wenn die letztendliche biologische Wirksamkeit der HA wesentlich durch postsynthetische Degradation beeinflusst wird (Fischer & Schrör, 2007), legen auch die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die durch die Has3 synthetisierte endogenen HA pro-angiogen wirken könnte. Diese Annahme gilt zumindest im Kontext des pathophysiologischen Modells der Hinterlaufischämie. Wie bereits dargestellt findet sich im Kontext von atherosklerotischen Plaques ein protektiver Effekt bei Has3-defizienten Mäusen mit Verringerung der Plaquegröße gegenüber WT-Kontrollen (Homann et al., 2018).

4.5.1 Modulation von Inflammation durch HA

In der besagten Arbeit von Homann et al. wird der beobachtete Effekt auf eine Reduktion der inflammatorischen Reaktion innerhalb der atherosklerotischen Läsionen zurückgeführt. Generell findet sich in der Literatur vielfach der Nachweis einer Reaktion der HA-Konzentration bei inflammatorischen Prozessen (Gerdin & Hällgren, 1997). Das physiologische Ablaufen einer Inflammationsreaktion ist ein wesentlicher Faktor für das Auftreten einer verstärkten Angiogenese nach ischämischem Reiz [Sasaki et al., (2002); Egami et al., (2006)]. In der Arbeit von Egami et al. zeigt sich in Mäusen mit einem *Knock-Out* des Leukozytenadhäsionsmoleküls P-Selektin eine verminderte Leukozyteninfiltration, eine verminderte VEGF-Konzentration sowie eine verminderte Kapillardichte gegenüber den WT-Kontrollen nach unilateraler Hinterlaufischämie. Dies weist auf eine Bedeutung des physiologischen Ablaufens einer Inflammationsreaktion für angiogene Prozesse des auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Ischämie-modells der unilateralen Hinterlaufischämie hin.

In Bezug auf HA ist eine Aktivierung von inflammatorischer Genexpression durch exogen zugeführte kurzkettige HA-Fragmente in Leukozyten beschrieben. Dabei erfolgt die Zellaktivierung durch die HA-Fragmente nicht über die sonst wesentlichen HA-Rezeptoren CD44 oder RHAMM, sondern über die Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, namentlich des *toll-like receptor 2* und 4 [Termeer et al., (2002); Jiang et al., (2005)]. Bei den *toll-like receptors* (TLR) handelt es sich um eine evolutionär alte Rezeptorproteinfamilie, welche der Erkennung von zellulären Gefahrensignalen und der konsekutiven Vermittlung einer Aktivierung des Immunsystems dient (Matzinger, 2002). Dabei scheinen die niedermolekularen HA-Fragmente ein ebensolches Gefahrensignal darzustellen, wohingegen hochmolekulare HA die pro-inflammatorische Signalübertragung der HA-Fragmente blockieren kann (Scheibner et al., 2006). Andererseits ist für exogen zugeführte HA-Tetrasaccharide, also kurzkettige HA-Fragmente, eine protektive Wirkung auf Neuronen in Form von verminderter Apoptoserate nach induzierter Ischämie im Mausmodell beschrieben, welche auf einer Inhibition des Signalweges des TLR2 beruht (Sunabori et al., 2016).

Schneckmann (2018) wies im Rahmen ihrer naturwissenschaftlichen Dissertation eine verminderte Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in die

ischämische Hinterlaufmuskulatur bei Has3-KO-Mäusen gegenüber den WT-Kontrollen 48 nach Induktion der Ischämie nach, ohne dass sich zu diesem Zeitpunkt eine erniedrigte systemische Zirkulation von Immunzellen im Blut zeigte. In der vorliegenden Arbeit erfolgte keine dezidierte Anfärbung von Leukozyten in der Hinterlaufmuskulatur. Zudem erfolgte die Analyse der Gewebeproben zu einem für eine Entzündungsreaktion späten Zeitpunkt von 35 Tagen nach Induktion der Ischämie. Unter diesen Einschränkungen zeigt sich weder in den HE-angefärbten Schnitten noch in der DAPI-Kernfärbung ein Hinweis auf eine erhöhte Zelldichte im Muskelgewebe als Zeichen einer vermehrten Leukozyteninfiltration. Dies trifft auf beide Testgruppen zu. Insgesamt ist eine Modulation der frühen post-ischämischen inflammatorischen Reaktion in den Has3-KO-Mäusen als denkbarer Einflussfaktor für die nachgewiesene verminderte Kapillardichte in Betracht zu ziehen und bietet Raum für weitere Forschung.

4.5.2 Interaktion von HA mit VEGF

Wie eingangs dargestellt, handelt es sich bei VEGF um einen wesentlichen Mediator von angiogenen Prozessen sowohl im physiologischen als auch im pathophysiologischen Kontext (Carmeliet, 2005). Über eine Heparin-bindende Domäne des VEGF-Moleküls kann auch HA direkt mit VEGF interagieren und so dessen biologische Aktivität beeinflussen, auch wenn diese Interaktion bei selektiv sulfatierten HA-Molekülen, die endogen nicht vorkommen, am ausgeprägtesten ist (Lim et al., 2016). *In vitro* zeigte sich eine vermehrte Gefäßtubulusbildung im Matrixgel-Essay nach gleichzeitiger Anreicherung des Nährmediums mit HA-Oligosacchariden und VEGF. Dieser Effekt war dabei stärker ausgeprägt als die Summe der Einzeleffekte nach jeweils alleiniger Substitution einer der beiden Substanzen (Montesano et al., 1996).

Auch *in vivo* finden sich Hinweise auf einen Synergismus von HA und VEGF. Im Angiogenesemodell bei Zebrafischen zeigten Mutanten mit einer non-funktionablen Tmem2-Hyaluronidase eine deutlich eingeschränkte Angiogenese gegenüber WT-Kontrollen, welche auf ein verminderte VEGF-A bzw -C Signaltransduktion zurückzuführen ist. Neben VEGF-Überexpression führte auch die direkte Substitution von HA-Oligosacchariden sowie die Injektion von Hyaluronidase zu einer Phänotyprettung (De Angelis et al., 2017). Desweiteren ist eine durch HA-vermittelte Erhöhung der VEGF-C Produktion von Makrophagen und daraus resultierend eine vermehrte

Lymphangiogenese *in vitro* beschrieben (Jung et al., 2015). Dabei Interagiert HA über TLR4 mit den Makrophagen. TLR4 wiederum ist wie die gesamte Familie der *toll-like receptors* ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr und in die Regulation zahlreicher inflammatorischer Prozesse eingebunden (Lu et al., 2008). HA scheint aber auch unabhängig von VEGF Angiogenese induzieren zu können. So ist eine erhöhte Gefäßbildung im HA- sowie VEGF-angereichertem *in vivo* Matrixgel-Essay bei Mäusen beschrieben. Diese Erhöhung blieb auch nach Anreicherung des Matrixgels mit HA und dem VEGF-Antikörper Bevacizumab nachweisbar (Park et al., 2012).

4.5.3 Die Rolle der Rezeptoren: CD44 und RHAMM

Zahlreiche Effekte von HA werden über als Hyaladherine bezeichnete Rezeptorproteine vermittelt. Insbesondere CD44 kommt dabei eine wesentliche Rolle als Rezeptorprotein für die pro-angiogenen Effekte von HA zu. Es findet sich auf der Oberfläche von zahlreichen Zelltypen, darunter glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Makrophagen und Granulozyten sowie Lymphozyten (Noble, 2002).

Somit ist CD44-vermittelte Signalübertragung einerseits über den Rezeptorbesatz von Makrophagen und Lymphozyten in inflammatorische Prozesse involviert, etwa im pathophysiologischen Kontext der atherosklerotischen Plaquebildung (Krolikoski et al., 2019). Andererseits kann CD44 durch sein Vorkommen auf dem Gefäßendothel auch direkt angiogene Signalkaskaden induzieren. Für exogen zugeführte HA-Oligosaccharide wurde bereits früh eine erhöhte Endothelzellproliferation durch CD44-vermittelte Aktivierung des proliferativen MAP-Kinase Signalwegs nachgewiesen (Slevin et al., 2007). Diesem kommt wiederum eine entscheidende Rolle im Rahmen der Angiogenese zu (Meadows et al., 2001). Zudem vermittelt CD44 eine Induktion von PAI-1, welches als Effektorprotein von TGF- β in angiogene Prozesse involviert ist (Park et al., 2012). Eine Blockierung von CD44 führt zu einer vermindert Gefäßbildung von Endothelzellen im Zellkulturmodell (Savani et al., 2001). Auch *in vivo* ist der pro-angiogene Effekt von CD44 nachgewiesen. So zeigen CD44 *Knock-Out* Mäuse eine verminderte Gefäßdichte in Tumoren und bei der Wundheilung (Cao et al., 2006). Die Affinität von HA für CD44 hängt von deren Moleküllänge ab und variiert zwischen den CD44-isoformen. Dabei kann ein hochmolekulares HA-Makromolekül die HA-Bindedomäne mehrerer CD44-Proteine besetzen, sodass diese einen Rezeptorkomplex bilden. Kommt es zu einer Degradation

des HA-Moleküls, besetzten die HA-Fragmente jeweils separat einen CD44-Rezeptor. Dadurch divergiert der CD44-Komplex auseinander und die einzelnen Rezeptoren können wiederum mit anderen Proteinen auf der Zelloberfläche interagieren, wie beispielweise RHAMM oder TLR2 und -4 (Abb. 4.3) (Cowman, 2017). Die HA-Fragmente scheinen dabei eine höhere Affinität zu CD44 zu besitzen als das Makromolekül (Tammi et al., 1998).

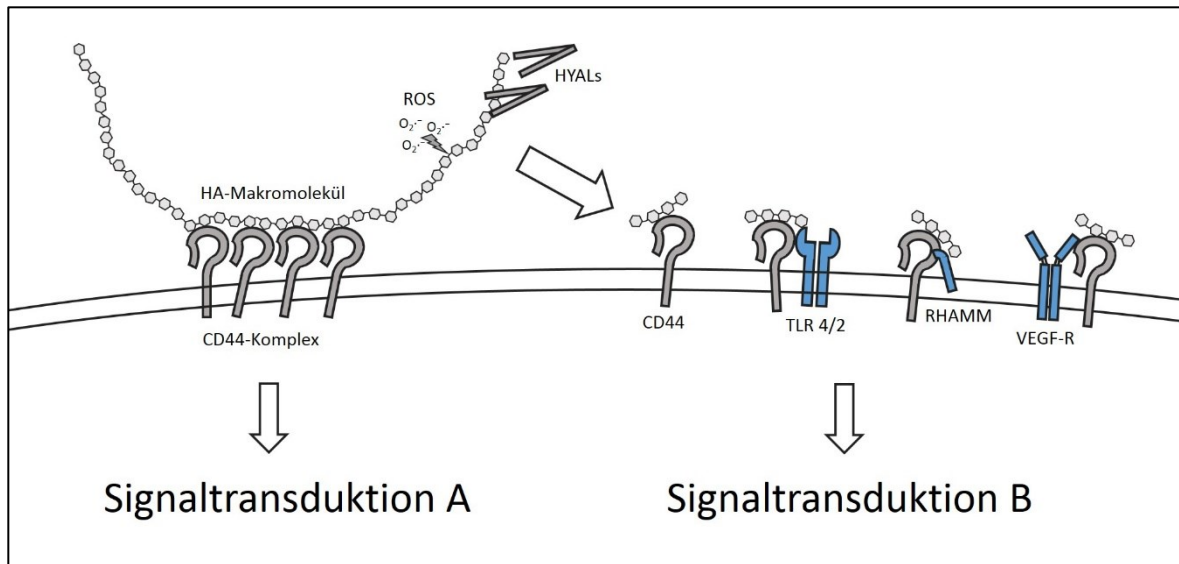


Abb. 4.3: Unterschiedliche Konfiguration von CD44 an der Zelloberfläche. Schematische dargestellt ist die Komplexierung von CD44 durch Bindung an ein langkettiges HA-Makromolekül. Durch Degradation dieses Makromoleküls separiert sich der Komplex aus CD44-Rezeptoren. Die nun separaten CD44-Rezeptoren können wiederum Interaktionen mit anderen Rezeptorproteinen auf der Zelloberfläche eingehen. HYALs = Hyaluronidasen, ROS = reaktive Sauerstoffspezies. **Abbildung modifiziert nach Cowman (2017).**

Insgesamt scheint eine Isoform von CD44, namentlich CD44v6, von besonderer Bedeutung für die angiogene Signalkaskade zu sein. CD44v6 bildet nach Aktivierung einen Komplex mit dem VEGF-Rezeptor 2 in Endothelzellkulturen und bewirkt eine verstärkte Zellmigration, Zellaussprossung und Gefäßtubulusbildung. Eine Blockierung von CD44v6 hebt dabei diese pro-angiogenen Effekte auf und führt zu einer Abnahme der Tumorgröße und Gefäßdichte in Mäusen injiziertem humanen Pankreastumorgewebe (Tremmel et al., 2009). Allerdings sind CD44-KO-Mäuse im Gegensatz zu VEGFR2-KO Mäusen, welche während der Embryonalentwicklung versterben, trotz der engen funktionellen Beziehung von CD44v6 und VEGFR2 überlebensfähig. Dies wird auf eine Substitution der CD44v6-Funktion im CD44-Knock-Out durch andere Proteine während der Embryonalentwicklung zurückgeführt (Matzke et al., 2007). Da sich die embryonale

Vaskulogenese von der postnatalen Angiogenese trotz funktioneller Gemeinsamkeiten unterscheidet, steht diese Beobachtung nicht im vollständigen Gegensatz zu der eingeschränkten angiogenen Potenz der CD44-KO-Mäuse.

Ein weiteres Rezeptorprotein, über welches HA möglicherweise Einfluss auf Angiogenese nimmt, ist RHAMM. Im Rahmen von HA-vermittelter Angiogenese im Mausmodell sowie humaner Endothelzellkultur ist eine vermehrte Expression von RHAMM beschrieben (Park et al., 2012). Wie auch CD44 vermittelt RHAMM proliferative Effekte über die Aktivierung der MAP-Kinase (Zhang et al., 1998). Über sein Vorkommen auf der Zelloberfläche kann RHAMM mit dem transmembranären CD44 interagieren (Misra et al., 2015). Ob RHAMM, beispielweise durch sein intrazelluläres Vorkommen, auch von CD44 unabhängige Effekte aufweist, ist bislang nicht abschließend geklärt. In der bereits erwähnten Publikation von Savani et al. zeigte sich in einer Endothelzellkultur zwar nach Blockade von CD44 und RHAMM eine jeweils ähnliche Verminderung der Gefäßbildung. In Bezug auf die Adhäsion von HA an Zellen zeigte sich jedoch nur nach CD44-Blockade ein Effekt, bei der Zellmigration wiederum nur bei RHAMM-Blockade (Savani et al., 2001).

In Bezug auf die endogene HA-Synthese scheint sich die Interaktion mit CD44 ähnlich wie bei exogen zugeführten (kurzkettigen) HA-Fragmenten zu verhalten. Eine Herabregulierung von HAS1 in humanen Urothelzellkarzinom-Zellen führte zu einer verminderten Expression von CD44 sowie einer verminderten Proliferationsrate der Zellen. Durch exogene HA-Substitution zeigte sich dieser Effekt teilweise reversibel. Bei einer zusätzlichen Blockierung von CD44 führte die exogene HA-Substitution allerdings nicht zu einem Wiederanstieg der Proliferation (Golshani et al., 2008). Zumindest im Tumorzellmodell weist CD44 also ein gemeinsames Expressionsverhalten mit mindestens einer endogenen HA-Synthase auf, was auf eine mögliche gemeinsame Regulation der HA-Synthasen und CD44 hinweist. In der vorliegenden Arbeit erfolgte keine Bestimmung der CD44-Expression im untersuchten Gewebe. Es ergibt sich daher die offene Fragestellung, ob sich zwischen den Has3-KO-Mäusen und den Wildtypen ein Unterschied in der CD44-Expression zeigt, oder ob ein vermindertes Substratangebot in Form kurzkettiger HA-Fragmente bei gleicher CD44-Präsenz für den ausbleibenden Anstieg der Kapillardichte nach ischämischem Reiz ausschlaggebend ist.

4.5.4 Die glatte Gefäßmuskulatur

Zwar besitzen Kapillaren keine *Tunica media*, jedoch sind auch sie durch eine schmale Schicht von Perizyten mit Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (VSMC) umgeben (Attwell et al., 2016). Im Rahmen der Angiogenese kommt es zu einer PDGF-B abhängigen Rekrutierung von Perizyten durch unreife Endothelzellen (Hellström et al., 1999) und durch diese wiederum zu einer Stabilisierung der Endothelzellschicht und damit des sich neu bildenden Gefäßastes (Herbert & Stainier, 2011). Zudem ändern Perizyten in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli ihr Sekretionsverhalten und können so auch eine Modulation etwa eines hypoxischen oder inflammatorischen Milieus bewirken (Gaceb & Paul, 2018). Gerade im inflammatorischen Kontext kommt den Perizyten über Vermittlung von Neutrophilenadhäsion und -transmigration eine tragende Rolle zu (Proebstl et al., 2012).

In Bezug auf die HA-Synthasen ist die HAS2 die am prominentesten vertretende Isoform in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (Evanko et al., 2001). Im Zellkulturmodell zeigt sich eine vermehrte Expression von HAS1 und -2 in VSMCs nach Stimulation mit vasoaktiven Prostaglandinen (Sussmann et al., 2004). Auch PDGF-B und TGF- β bewirken eine vermehrte Expression von HAS2. Interessanterweise gilt dies nicht für HAS3, welche nur nach Stimulation mit Interleukin-1 eine vermehrte Expression aufweist (van den Boom et al., 2006). Dafür zeigen VSMCs nach einem lentiviralen *Knock-Down* der HAS3 eine verminderte PDGF-B Sekretion und Zellmigration. Auch weisen diese Zellen im Umkehrschluss nach einer Überexpression der HAS3 ein deutlich gesteigertes Migrationsverhalten als Reaktion auf eine PDGF-B Stimulation auf (Kiene et al., 2016).

An dieser Stelle sei auch nochmals die Arbeit von Wang et al. erwähnt, in welcher sich in *Has2-Knock-Out*-Mäusen eine verminderte Perfusion der ischämischen Wadenmuskulatur gegenüber WT-Kontrollen bei allerdings erhöhter Kapillardichte zeigte (Wang et al., 2020). Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, bei denen sich zwar ebenfalls eine schlechtere Reperfusion der *Knock-Out*-Mäuse zeigte, dabei allerdings in der immunhistochemischen Färbung der Muskulatur eine erniedrigte Kapillardichte. Wang et al. schreiben den scheinbaren Widerspruch einer deutlich schlechteren Reperfusion und einer signifikant erhöhten Kapillardichte einer fehlenden Ausreifung des endothelialen Gefäßsystems zu. So zeigten sich in den *Has2-KO*-Tieren eine

erhöhte Extravasation von Erythrozyten sowie Ödeme des Muskelgewebes, beides Phänomene, die in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet wurden. Auch wiesen die Has2-KO-Tiere nach doppelter Ligatur der *Arteria femoralis* und *Arteria iliaca* eine hohe Rate an Nekrosen bis hin zum Verlust der Extremität auf, so dass auf eine einzelne Ligatur der Femoralarterie gewechselt wurde. Dabei handelt es sich genetisch ursprünglich um C57BL/6-Mäuse, welche tendenziell eine gute Erholung nach induzierter Ischämie zeigen. So wurden auch in der vorliegenden Arbeit auf C57BL/6-Wildtypen basierende *Knock-Outs* verwendet, bei diesen wurden dabei trotz verminderter Reperfusion keine klinischen Zeichen der kritischen Extremitätenischämie beobachtet.

Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der Art des jeweiligen *Knock-Outs*. So handelt sich in der vorliegenden Arbeit um einen konstitutiven *Knock-Out* der Has3, welcher also schon während der Embryonalentwicklung besteht. Da dies bei einem Has2-KO letal ist, erfolgte in der Arbeit von Wang et al. ein konditionaler, also postnatal induzierter *Knock-Out* der Has2. Zudem handelt sich dabei um einen endothelspezifischen *Knock-Out*. Somit könnte ein möglicher Unterschied auf die Entwicklung von Kompensationsmechanismen nach Verlust der Has3 zurückzuführen sein.

In der vorliegenden Arbeit waren nur vereinzelt für α SMA-positive perifibrilläre Signale abgrenzbar, obwohl auch Perizyten noch α SMA-enthaltende kontraktile Fasern besitzen (Skalli et al., 1989). Allerdings handelt es sich dabei um nur wenige Fasern im Verhältnis zu den VSMCs kaliberstärkerer Gefäße. Auch deshalb findet als Marker für Perizyten häufig das Rezeptorprotein PDGFR β Verwendung (Smyth et al., 2018). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fand keine spezifische Anfärbung von Perizyten statt. Insgesamt ist basierend auf der Literatur aber davon auszugehen, dass auch die hier dargestellten Kapillaren von Perizyten umgeben sind. Da auch das Signalverhalten von VSMCs einer Modulation durch die HA-Synthasen unterliegt, kommt somit ein verändertes Signalverhalten nach *Knock-Out* der Has3 ebenfalls als potentieller Effektor auf die Angiogenese in Betracht.

In Abb. 4.4 sind die vielschichtigen Möglichkeiten der Einflussnahme der Hyaluronsäuresynthese auf Angiogenese schematisch dargestellt.

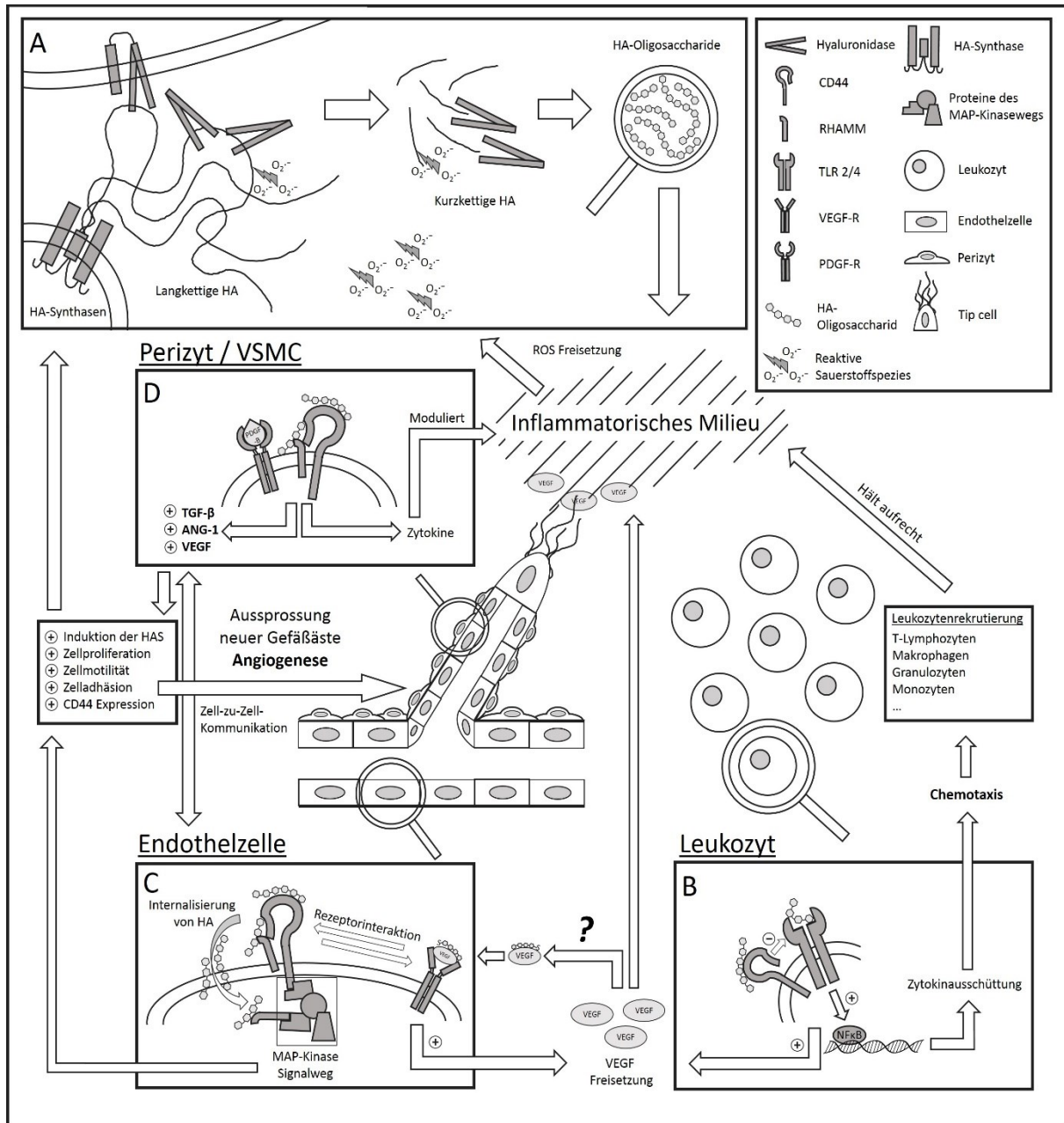


Abb. 4.4: Mögliche Mechanismen des Effektes der endogenen HA-Synthese auf Angiogenese. Schematische dargestellt ist der endogene Weg von der HA-Synthese bis zu möglichen Effektoren. Grundsätzlich sind alle HA-Synthasen in der Lage, langkettige HA-Makromoleküle zu produzieren, auch die in dieser Arbeit untersuchte Has3. **(A)** Über enzymatische und nicht-enzymatische Degradation entstehen als endogene Reaktion auf einen gewebsschädigenden Reiz (wie etwa einen ischämischen Zustand) schließlich HA-Oligosaccharide. Diese sind charakteristischer Bestandteil eines inflammatorischen Milieus. Innerhalb dessen kommt es zur Aktivierung zahlreicher Signalkaskaden, auch durch die HA-Fragmente. **(B)** So wird über die Stimulation von Leukozyten einerseits das inflammatorische Milieu aufrechterhalten, andererseits beispielsweise über eine erhöhte Freisetzung von VEGF das Gefäßendothel stimuliert. Unter Differenzierung zu *tip cells* kommt es zu Einsprossung neuer Gefäßäste in das inflammatorische Milieu. **(C)** Dabei werden die Endothelzellen durch die HA-Oligosaccharide im Sinne einer pro-proliferatorischen Reaktion direkt stimuliert und ihrerseits sekretorisch aktiv. **(D)** Dies stimuliert die umgebenden Perizyten, die durch Zell-zu-Zell-Kommunikation mit dem Endothel einerseits dessen Ausreifung und Stabilisierung induzieren, andererseits durch Zytokinfreisetzung und Leukozytenadhäsion auch das inflammatorische Milieu modulieren. Auch die Perizyten selbst unterliegen dabei einer HA-vermittelten Signaltransduktion.

Die vorliegende Arbeit legt nahe, dass diese endogene Achse über noch näher zu bestimmende Mechanismen ebendiese Effekte induziert, wie sie bereits für exogen zugeführten HA-Oligosaccharide nachgewiesen sind. ? = Eine direkte Interaktion von HA mit VEGF ist bislang insbesondere nach zuvoriger exogener Sulfatierung der HA beschrieben. **Eigene Abbildung, Teil A modifiziert nach Jiang, Liang & Noble (2011).**

4.6 Akkumulation von Hyaluronsäure

In Bezug auf sowohl den HA-Gehalt des Gewebes als auch auf das Verteilungsmuster der HA im Gewebe der Hinterlaufmuskulatur zeigten sich zwischen den *Has3-Knock-Out*-Mäusen und den Wildtyp-Kontrollen keine signifikanten Unterschiede.

Es ist beschrieben, dass der HA-Gehalt zumindest in epidermalem Gewebe während der prä- und postnatalen Entwicklung Schwankungen unterlegen ist, welche mit der Expression von *Has2* und *-3* korrelieren (Tammi et al., 2005). Desweiteren wurde gezeigt, dass es im Mausmodell physiologischer Weise in der Frühphase nach erlittener Myokardischämie zu einer auch immunhistochemisch nachweisbaren Akkumulation von HA im Myokardgewebe kommt, welche bei *Has2-Knock-Out*-Mäusen ausbleibt (Petz et al., 2019). Zumindest lichtmikroskopisch findet sich im Kontext der vorliegenden Arbeit kein Effekt auf die HA-Verteilung im Muskelgewebe bei embryonaler *Has3*-Defizienz, weder konstitutionell noch nach erlittener Ischämie.

Offen bleibt die Frage, ob es sich hierbei um eine Zeitpunkt- oder *Has*-Isoform-abhängige Beobachtung handelt. Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Präparate zeigen einen Zustand 35 Tage nach erlittener Ischämie und liegen damit außerhalb der Akutphase. Der in der Arbeit von Petz et al. beschriebene Effekt zeigte sich bereits 24 Stunden nach erlittener Myokardischämie. Allerdings ließ sich dort auch in der chronischen Phase eine Veränderung in der EZM in Form eines vergrößerten myokardialen Narbenareals der *Knock-Out*-Mäuse 3 Wochen nach Ischämie feststellen. Dieser späte Effekt war dabei allerdings wiederum spezifisch für den *Knock-Out* der *Has2*. Bei *Has1*-Deletion ließ sich kein Unterschied in der Größe des Narbenareals im Vergleich zum Wildtyp feststellen. Auch zeigten sich in der vorliegenden Arbeit keine mikroskopischen Gewebeschäden. In den untersuchten Gewebeproben zeigten sich keine Nekroseareale, interstielle Ödembildung, vermehrte Fibrosierung oder anhaltende Inflammation in Form von Makrophageneinwanderung in die Muskulatur. Eine klinisch relevante Myokardischämie

hingegen stellt ein relevantes Gewebetrauma dar, welches mit entsprechendem Gewebeuntergang und somit auch der Initiierung von Wundheilung verbunden ist.

Im Rahmen von physiologisch ablaufende Wundheilung ist HA ein wesentlicher Mediator (Aya & Stern, 2014). Da die hier verwendeten C57BL/6J-Mäuse eine gute Kollateralisierung zeigen, mag das Fehlen von ischämischen Nekrosearealen die fehlende erhöhte HA-Akkumulation auch bei den Wildtypmäusen bedingen. Hierfür würde auch das über alle Präparate beobachtete physiologische Verteilungsmuster der HA-Signale vor allem im Bereich von Bindegewebsstrukturen im Sinne von Gefäß-Nerven-Scheiden sprechen. Abschließend stellt die im Rahmen dieser Arbeit dargelegte Beobachtung zum Zeitpunkt von 35 Tagen nach unilateraler Hinterlaufischämie nur eine limitierte Momentaufnahme dar. Es lässt sich daher keine Aussage darüber treffen, ob es innerhalb der Akutphase nach induzierter Ischämie auch bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ischämiemodell zu einer vorübergehenden Veränderung in der EZM kommt.

4.7 Therapeutische Perspektiven

Es ist beschrieben, dass lokale Überexpression von Hämooxygenase (HO)-1 in ischämischer Hinterlaufmuskulatur in HO1-*Knock-Out*-Mäusen zu einer Phänotyp-Rettung führt. Nach Plasmid-Vektor vermittelter Überexpression von sowohl HO1 als auch HO1 und VEGF in Kombination zeigte sich eine Reperfusion des ischämischen Hinterlaufs, welche sich nicht signifikant von den WT-Kontrollen Unterschied (Jazwa et al., 2015). Der dabei benutzte HO1-*Knock-Out*-Phänotyp zeigt ähnlich dem in der vorliegenden Arbeit untersuchenden Has3-*Knock-Out*-Phänotyp eine eingeschränkte Kapillarbildung nach erlittener Ischämie (Jazwa et al., 2013). In der oben genannten Arbeit von Jazwa et al. (2015) führte bereits eine alleinige Überexpression von HO1 zu einer Aufhebung der eingeschränkten Erholung nach erlittener Hinterlaufischämie. In Kombination mit einer zusätzlichen Überexpression VEGF zeigte sich eine weitere Verbesserung der Rekapillarisation.

Im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit ergibt sich daraus die Fragestellung, ob durch eine Has3-Überexpression – systemisch oder lokal in der Hinterlaufmuskulatur – eine Phänotyp-Rettung eintritt, und falls ja, ob sich dieser Effekt ebenfalls synergistisch mit zusätzlicher VEGF-Überexpression zeigen würde. Die Studienlage zu einem

Hyaluronsäuresynthesen-Gentransfer ist eingeschränkt. Studien in Bezug auf Überexpression der Hyaluronsäuresynthesen beziehen sich in überwiegender Anzahl entweder auf Zellen der Gefäßmuskulatur im Zusammenhang mit Atherosklerose [Wilkinson et al., (2006); Chai et al., (2005)] oder auf maligne Zelllinien im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen [Takabe et al., (2015); Li et al., (2015)]. Zwar ist die technische Machbarkeit einer Überexpression von caniner Has2 in Hunde-Kniegelenke beschrieben (Kyostio-Moore et al., 2018), zur Überexpression von Hyaluronsäuresynthesen in der Skelettmuskultur, insbesondere im Zusammenhang mit Ischämie-Modellen, findet sich allerdings keine belastbare Literatur. Die Datenlage zur sonstigen therapeutischen Nutzung von HA bei ischämischen Krankheitsbildern ist ebenfalls eingeschränkt. So ist zwar eine verbesserte Rekapillarisation durch Injektion von endothelialen Stammzellen zusammen mit HA nach induzierter Ischämie im Mausmodell beschrieben (Tang et al., 2011), ebenso ist dieser Effekt nach der Implantation von HA-Hydrogelen in den ischämischen Hinterlauf gezeigt worden (Silva et al., 2016). Eine so robuste Datenlage wie im Zusammenhang mit VEGF existiert aber nicht.

Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Effekt von Has3-Defizienz auf die Erholung nach unilateraler Hinterlaufischämie legt nahe, möglichen Effekten von Has3-Überexpression in ischämischem Muskelgewebe nachzugehen. So könnte die Rolle der endogenen Hyaluronsäuresynthese im Kontext von Angiogenese weiter beleuchtet werden, um langfristig möglicherweise einen therapeutischen Ansatz im Kontext der chronischen Extremitätenischämie im Rahmen der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit aufzuzeigen.

4.8 Schlussfolgerung

4.8.1 Zusammenfassende Beantwortung der Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu zwei eingangs herausgearbeiteten Fragestellungen Stellung zu beziehen:

- 1.) Gibt es einen Unterschied im Ausmaß der Angiogenese im Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie in Bezug auf ischämische und nicht-ischämische Wadenmuskeln von Hyaluronsäuresynthase(Has)-3-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp(WT)-Kontrollen?
- 2.) Gibt es Unterschiede in der Akkumulation/Verteilung von Hyaluronsäure in der ischämischen und nicht-ischämischen Wadenmuskulatur von Has3-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp(WT)-Kontrollen?

Ad 1.) Nach Induktion einer unilateralen Hinterlaufischämie und anschließender Erholungsphase von 35 Tagen zeigte sich in der dann durchgeführten histologischen Untersuchung der Wadenmuskulatur ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Testgruppen. Während es bei den WT-Kontrollen zu einem Anstieg der Kapillardichte um etwa 30% als Reaktion auf den ischämischen Reiz kam, blieb dieser Anstieg bei den Has3-KO-Tieren vollständig aus. Diese zeigten keinen Unterschied gegenüber der Kapillardichte des nicht-ischämischen Hinterlaufes. Diese histologische Beobachtung deckt sich desweiteren mit den in Vorarbeiten durch Herr Dr. Freudenberger am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikum Düsseldorf durchgeführten nicht-invasiven Durchblutungsmessungen, in welchen die Has3-KO-Mäuse einen Trend zu einer verringerten Durchblutung des ischämischen Beines gegenüber den WT-Kontrollen zeigten.

Ad 2.) Anders verhält es sich in Bezug auf den HA-Gehalt des Gewebes. Zwar ließ sich HA immunhistochemisch in den histologischen Präparaten nachweisen und zeigte ein Verteilungsmuster, wie es im Gewebe der Skelettmuskulatur zu erwarten ist. Dabei zeigte sich aber weder ein Unterschied in Bezug auf den absoluten HA-Gehalt des Gewebes im

Sinne einer Akkumulation in einer der beiden Testgruppen, noch ein verändertes Verteilungsmuster bei den Has3-defizienten Mäusen gegenüber den WT-Kontrollen.

4.8.2 Fazit

Abschließend konnte diese Arbeit zeigen, dass das Defizit einer funktionablen Hyaluronsäuresynthase-3 mit einem verminderten angiogenen Potenzial nach erlittener Extremitätenischämie einhergeht. Auf einen (histologisch nachweisbaren) Unterschied der HA-Konzentration oder –verteilung im Gewebe zum Zeitpunkt 35 Tage nach Induktion der Ischämie ist der beobachtete Effekt auf die Angiogenese dabei nicht zurückzuführen. Allerdings ist die Rolle von HA im Rahmen der Angiogenese ein weiterhin aktiv diskutiertes und beforschtes Themengebiet, in welchem längst nicht alle Fragestellungen abschließend geklärt sind. Insgesamt ist in der Literatur ein breites Spektrum an potentiellen Mechanismen beschrieben, über welche HA in angiogene Prozesse eingreifen kann. Weiterhin Gültigkeit behält dabei die grundlegende Aussage, dass die kurzkettigen HA-Fragmente für pro-angiogene Effekte entscheidend sind. Dabei scheinen die endogenen HA-Synthasen, beziehungsweise das Zusammenspiel aus endogener HA-Synthese und –degradation, den Effekt einer exogenen Substitution von HA-Oligosacchariden auch selbstreguliert bewirken zu können. Diese These unterstützt auch das Ergebnis der vorliegenden Arbeit. Über welchen Mechanismus der beobachtete Effekt eines verminderten angiogenen Potenzials bei den Has3-defizienten Mäusen nach erlittener Extremitätenischämie nun vermittelt wird, kann anhand der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Ob das Fehlen einer funktionellen Has3 über

- die Modulation der inflammatorischen Reaktion unter Involvierung von Makrophagen
- eine VEGF vermittelte Signaltransduktion
- eine direkte Kommunikation mit den Endothelzellen über CD44/RHAMM
- eine Veränderung des Expressionsmusters der Hyaladherine
- eine veränderte Zell-zu-Zell Kommunikation zwischen Endothel und Perizyten
- oder über ein Mischbild aus den oben genannten Faktoren

wesentlich für den beobachteten Effekt ist, stellt allerdings eine interessante Fragestellung dar und bietet Anlass für weitere Forschung in Bezug auf die Rolle und Mechanismen der endogenen HA-Synthese im Kontext von Angiogenese.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adam, D., Beard, J., Cleveland, T., Bell, J., Bradbury, A., Forbes, J., Fowkes, F., Gillespie, I., Ruckley, C., Raab, G. & Storkey, H., *Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial*. Lancet, 2005. **366**(9501): pp. 1925-1934.
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C., O'Farrell, F. & Dalkara, T., *What is a pericyte?*. J Cereb Blood Flow Metab, 2016. **36**(2): pp. 451-455.
- Aya, K. & Stern, R., *Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player*. Wound Repair Regen, 2014. **22**(5): pp. 579-593.
- Bai, K., Spicer, A., Mascarenhas, M., Yu, L., Ochoa, C., Garg, H. & Quinn, D., *The role of hyaluronan synthase 3 in ventilator-induced lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(1): pp. 92-98.
- Balazs, E. & Band, P., *Therapeutic Use of Hyaluronan-Based Products*. In H. Garg, M. Cowman & C. Hales, Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications (S. 311-332). 2008. Amsterdam, Elsevier.
- Bates, D., Cui, T., Doughty, J., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J., Peat, D., Gillatt, D. & Harper, S., *VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma*. Cancer Res, 2002. **62**(14): pp. 4123-31.
- Becker, B., Chappell, D., Bruegger, D., Annecke, T. & Jacob, M., *Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(2): pp. 300-310.
- Belizário, J., Akamini, P., Wolf, P., Strauss, B. & Xavier-Neto, J., *New routes for transgenesis of the mouse*. J Appl Genet, 2012. **53**(3): pp. 295-315.
- Bennet, H., *Morphological aspects of extracellular polysaccharides*. J Histochem Cytochem, 1963. **11**(1): pp. 14-23.
- Bourguignon, V. & Flamion, B., *Respective roles of hyaluronidases 1 and 2 in endogenous hyaluronan turnover*. FASEB journal, 2016. **30**(6): pp. 2108-2114.
- Bruegger, D., Jacob, M., Rehm, M., Loetsch, M., Welsch, U., Conzen, P. & Becker, B., *Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(5): pp. 1993-1999.
- Buono, C., Binder, C., Stavrakis, G., Witztum, J., Glimcher, L. & Lichtman, A., *T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): pp. 1596-1601.
- Burns, P., Gough, S. & Bradbury, A., *Management of peripheral arterial disease in primary care*. BMJ, 2003. **326**(7389): pp. 584-588.
- Camenisch, T., Spicer, A., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M., Calabro, A. J., Kubalak, S., Klewer, S. & McDonald, J., *Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme*. J Clin Invest, 2000. **106**(3): pp. 349-360.
- Cao, G., Savani, R., Fehrenbach, M., Lyons, C., Zhang, L., Coukos, G. & Delisser, H., *Involvement of endothelial CD44 during in vivo angiogenesis*. Am J Pathol, 2006. **169**(1): pp. 325-336.

- Carmeliet, P., *VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer*. *Oncology*, 2005. **69**(Suppl 3): pp. 4-10.
- , *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. *Nature medicine*, 2000. **6**(4): pp. 389-395.
- Carmeliet, P. & Jain, R., *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. *Nature*, 2011. **473**(7347): pp. 298-307.
- Chai, S., Chai, Q., Danielsen, C., Hjorth, P., Nyengaard, J., Ledet, T., Yamaguchi, Y., Rasmussen, L. & Wogensen, L., *Overexpression of hyaluronan in the tunica media promotes the development of atherosclerosis*. *Circ Res*, 2005. **96**(5): pp. 583-591.
- Cherr, G., Yudin, A. & Overstreet, J., *The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling*. *Matrix Biol*, 2001. **20**(8): pp. 515-525.
- Cheung, K., Ma, L., Wang, G., Coe, D., Ferro, R., Falasca, M., Buckley, C., Mauro, C. & Marelli-Berg, F., *CD31 signals confer immune privilege to the vascular endothelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(43): pp. E5815-5824.
- Corsi, A., Xu, T., Chen, X., Boyde, A., Liang, J., Mankani, M., Sommer, B., Iozzo, R., Eichstetter, I., Robey, P., Bianco, P. & Young, M., *Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues*. *J Bone Miner Res*, 2002. **17**(7): pp. 1180-1189.
- Cowman, M., *Hyaluronan and Hyaluronan Fragments*. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 2017. **74**: pp. 1-59.
- Csoka, A., Frost, G. & Stern, R., *The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes*. *Matrix biology*, 2001. **20**(8): pp. 499-508.
- Danielli, J., *Capillary permeability and oedema in the perfused frog*. *J Physiol*, 1940. **1**: pp. 109-129.
- Day, A. & Prestwich, G., *Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): pp. 4585-4588.
- De Angelis, J., Lagendijk, A., Chen, H., Tromp, A., Bower, N., Tunny, K., Brooks, A., Bakkers, J., Francois, M., Yap, A., Simons, C., Wicking, C., Hogan, B. & Smith, K., *Tmem2 Regulates Embryonic Vegf Signaling by Controlling Hyaluronic Acid Turnover*. *Dev Cell*, 2017. **40**(2): pp. 123-136.
- Denny, P. & Justice, M., *Mouse as the measure of man?*. *Trends Genet*, 2000. **16**(7): pp. 283-287.
- Diehm, C., Allenberg, J., Pittrow, D., Mahn, M., Tepohl, G., Haberl, R., Darius, H., Burghaus, I. T. & Group., G. E., *Mortality and vascular morbidity in older adults with asymptomatic versus symptomatic peripheral artery disease*. *Circulation*, 2009. **120**(21): pp. 2053-2061.
- Donker, J., de Vries, J., Ho, G., Gonçalves, F., Hoeks, S., HJ, V. & van der Laan, L., *Review: Quality of life in lower limb peripheral vascular surgery*. *Vascular*, 2016. **24**(1): pp. 88-95.
- Driesen, T., Schuler, D., Schmetter, R., Heiss, C., Kelm, M., Fischer, J. & Freudenberger, T., *A systematic approach to assess locoregional differences in angiogenesis*. *Histochemistry and Cell Biology*, 2016. **145**(2): pp. 213-225.
- Duvall, W. & Vorchheimer, D., *Multi-bed vascular disease and atherothrombosis: scope of the problem*. *J Thromb Thrombolysis*, 2004. **17**(1): pp. 51-61.

- Egami, K., Murohara, T., Aoki, M. & Matsuishi, T., *Ischemia-induced angiogenesis: role of inflammatory response mediated by P-selectin*. Journal of Leukocyte Biology, 2006. **79**(5): pp. 971-979.
- Eldridge, L., Moldobaeva, A. & Wagner, E., *Increased hyaluronan fragmentation during pulmonary ischemia*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **301**(5): pp. L782-788.
- Esko, J., Kimata, K. & Lindahl, U., *Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans*. Essentials of Glycobiology. 2nd edition, 2009. (Chapter 16).
- Evanko, S., Johnson, P., Braun, K., Underhill, C., Dudhia, J. & Wight, T., *Platelet-derived growth factor stimulates the formation of versican-hyaluronan aggregates and pericellular matrix expansion in arterial smooth muscle cells*. Arch Biochem Biophys, 2001. **394**(1): pp. 29-38.
- Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy*. Oncologist, 2004. **9**(Suppl 1): pp. 2-10.
- Ferrara, N. & Henzel, W., *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **161**(2): pp. 851-858.
- Finger, R., Fleckenstein, M., Scholl, H. & Holz, F., *Therapeutic anti-VEGF in ophthalmology: physiopathology and treatment of age-related macular degeneration*. Pharm Unserer Zeit, 2007. **36**(6): pp. 424-430.
- Fischer, J., *Role of hyaluronan in atherosclerosis: Current knowledge and open questions*. Matrix Biol, 2019. **78-79**: pp. 324-336.
- Fischer, J. & Schrör, K., *Regulation of hyaluronan synthesis by vasodilatory prostaglandins. Implications for atherosclerosis*. Thrombosis and haemostasis, 2007. **98**(2): pp. 287-295.
- Gaceb, A. & Paul, G., *Pericyte Secretome*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1109**: pp. 139-163.
- Gao, F., Liu, Y., He, Y., Yang, C., Wang, Y., Shi, X. & Wei, G., *Hyaluronan oligosaccharides promote excisional wound healing through enhanced angiogenesis*. Matrix Biol, 2010. **29**(2): pp. 107-116.
- Gaudette, S., Hughes, D. & Boller, M., *The endothelial glycocalyx: Structure and function in health and critical illness*. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), 2020. **30**(2): pp. 117-134.
- Gerdin, B. & Hällgren, R., *Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation*. J Intern Med, 1997. **242**(1): pp. 49-55.
- Golshani, R., Lopez, L., Estrella, V., Kramer, M., Iida, N. & Lokeshwar, V., *Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44*. Cancer Res, 2008. **68**(2): pp. 483-491.
- Gorsi, B. & Stringer, S., *Tinkering with heparan sulfate sulfation to steer development*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(4): pp. 173-177.
- Hanahan, D. & Folkman, J., *Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): pp. 353-364.
- Harries, R., Ahmed, M., Whitaker, C., Majeed, M. & Williams, D., *The influence of connective tissue disease in the management of lower limb ischemia*. Ann Vasc Surg, 2014. **28**(5): pp. 1139-1142.
- Heldin, P., Lin, C., Kolliopoulos, C., Chen, Y. & Skandalis, S., *Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production*. Matrix Biol, 2019. **78-79**: pp. 100-117.

- Helisch, A., Wagner, S., Khan, N., Drinane, M., Wolfram, S., Heil, M., Ziegelhoeffer, T., Brandt, U., Pearlman, J., Swartz, H. & Schaper, W., *Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(3): pp. 520-526.
- Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A. & Betsholtz, C., *Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse*. *Development*, 1999. **126**(14): pp. 3047-3055.
- Herbert, S. & Stainier, D., *Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(9): pp. 551-564.
- Homann, S., Grandoch, M., Kiene, L., Podsvyadek, Y., Feldmann, K., Rabausch, B., Nagy, N., Lehr, S., Kretschmer, I., Oberhuber, A., Bollyky, P. & Fischer, J., *Hyaluronan synthase 3 promotes plaque inflammation and atheroprogession*. *Matrix Biol*, 2018. **66**pp. 67-80.
- lozzo, R., *Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling*. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 2005. **6**(8): pp. 646-656.
- lozzo, R., Chakrani, F., Perrotti, D., McQuillan, D., Skorski, T., Calabretta, B. & Eichstetter, I., *Cooperative action of germ-line mutations in decorin and p53 accelerates lymphoma tumorigenesis*. *Proceedings of the National Academy of Science of the U S A*, 1999. **96**(6): pp. 3092-3097.
- Irie, H., Tatsumi, T., Takamiya, M., Zen, K., Takahashi, T., Azuma, A., Tateishi, K., Nomura, T., Hayashi, H., Nakajima, N., Matsubara, H., *Carbon dioxide-rich water bathing enhances collateral blood flow in ischemic hindlimb via mobilization of endothelial progenitor cells and activation of NO-cGMP system*. *Circulation*, 2005. **111**(12): pp. 1523-1529.
- Itano, N. & Kimata, K., *Mammalian hyaluronan synthases*. *IUBMB Life*, 2002. **54**(4): pp. 195-199.
- Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, A., McDonald, J. & Kimata, K., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(35): pp. 25085-92.
- Järvinen, T. & Prince, S., *Decorin: A Growth Factor Antagonist for Tumor Growth Inhibition*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 654765.
- Jazwa, A., Florczyk, U., Grochot-Przeczek, A., Krist, B., Loboda, A., Jozkowicz, A. & Dulak, J., *Limb ischemia and vessel regeneration: Is there a role for VEGF?* *Vascul Pharmacol*, 2016. **86**: pp. 18-30.
- Jazwa, A., Stepniewski, J., Zamykal, M., Jagodzinska, J., Meloni, M., Emanuelli, C., Jozkowicz, A. & Dulak, J., *Pre-emptive hypoxia-regulated HO-1 gene therapy improves post-ischaemic limb perfusion and tissue regeneration in mice*. *Cardiovasc Res*, 2013. **97**(1): pp. 115-124.
- Jazwa, A., Stoszko, M., Tomczyk, M., Bukowska-Strakova, K., Pichon, C., Jozkowicz, A. & Dulak, J., *HIF-regulated HO-1 gene transfer improves the post-ischemic limb recovery and diminishes TLR-triggered immune responses - Effects modified by concomitant VEGF overexpression*. *Vascul Pharmacol*, 2015. **71**: pp. 127-138.
- Jiang, D., Liang, J., Yu, S., Chen, S., Luo, Y., Prestwich, G., Mascarenhas, M., Garg, H., Quinn, D., Homer, R., Goldstein, D., Bucala, R., Lee, P., Medzhitov, R. & Noble, P., *Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan*. *Nat Med*, 2005. **11**(11): pp. 1173-1179.

- Jiang, D., Liang, J. & Noble, P., *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(1): pp. 221-264.
- Jiang, L., Lin, L., Li, R., Yuan, C., Xu, M., Huang, J. & Huang, M., *Dimer conformation of soluble PECAM-1, an endothelial marker*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016. **77**(Pt A): pp. 102-108.
- Jung, Y., Lee, A., Nguyen-Thanh, T., Kang, K., Lee, S., Jang, K., Kim, M., Park, S. & Kim, W., *Hyaluronan-induced VEGF-C promotes fibrosis-induced lymphangiogenesis via Toll-like receptor 4-dependent signal pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **466**(3): pp. 339-345.
- Ju, R., Wen, Y., Gou, R., Wang, Y. & Xu, Q., *The experimental therapy on brain ischemia by improvement of local angiogenesis with tissue engineering in the mouse*. *Cell Transplant*, 2014. **23**(Suppl 1): pp. 83-95.
- Kiene, L., Homann, S., Suvorava, T., Rabausch, B., Müller, J., Kojda, G., Kretschmer, I., Twarock, S., Dai, G., Deenen, R., Hartwig, S., Lehr, S., Köhrer, K., Savani, R., Grandoch, M. & Fischer, J., *Deletion of Hyaluronan Synthase 3 Inhibits Neointimal Hyperplasia in Mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(2): pp. e9-16.
- Klaphake, S., de Leur, K., Mulder, P., Ho, G., de Groot, H. V. & van der Laan, L., *Life Expectancy and Outcome of Different Treatment Strategies for Critical Limb Ischemia in the Elderly Patients*. *Ann Vasc Surg*, 2018. **46**: pp. 241-248.
- Knudson, C. & Knudson, W., *Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism*. *Clinical orthopaedics and related research*, 2004. **427**(Suppl): pp. 152-162.
- Kolodgie, F., Burke, A., Farb, A., Weber, D., Kutys, R., Wight, T. & Virmani, R., *Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(10): pp. 1642-1648.
- Krolikoski, M., Monslow, J. & Puré, E., *The CD44-HA axis and inflammation in atherosclerosis: A temporal perspective*. *Matrix Biol*, 2019. **78-79**: pp. 201-210.
- Kyostio-Moore, S., Berthelette, P., Cornell, C., Nambiar, B. & Figueiredo, M., *Hyaluronic acid synthase-2 gene transfer into the joints of Beagles by use of recombinant adeno-associated viral vectors*. *Am J Vet Res*, 2018. **79**(5): pp. 505-517.
- Lawall, H., Huppert, P., Espinola-Klein, C. & Rümenerapf, G., *S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit*. *Dtsch Arztebl Int*, 2016. **113**(43): pp. 729-736.
- Lees, V., Fan, T. & West, D., *Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan*. *Lab Invest*, 1995. **73**(2): pp. 259-266.
- Liang, J., Jiang, D. & Noble, P., *Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016. **97**: pp. 186-203.
- Limbourg, A., Korff, T., Napp, L., Schaper, W., Drexler, H. & Limbourg, F., *Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(12): pp. 1737-1746.
- Lim, D., Wylie, R., Langer, R. & Kohane, D., *Selective binding of C-6 OH sulfated hyaluronic acid to the angiogenic isoform of VEGF(165)*. *Biomaterials*, 2016. **77**: pp. 130-138.

- Lin, S., Chang, F., Schrimpf, C., Chen, Y., Wu, C., Wu, V., Chiang, W., Kuhnert, F. K., Chen, Y., Wu, K., Tsai, T. & Duffield, J., *Targeting Endothelium-Pericyte Cross Talk by Inhibiting VEGF Receptor Signaling Attenuates Kidney Microvascular Rarefaction and Fibrosis*. *The American Journal of Pathology*, 2011. **178**(2): pp. 911-923.
- Lindén, M., Sirsjö, A., Lindbom, L., Nilsson, G. & Gidlöf, A., *Laser-Doppler perfusion imaging of microvascular blood flow in rabbit tenuissimus muscle*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(4 PT 2): pp. H1496-500.
- Liu, N., Gao, F., Han, Z., Xu, X., Underhill, C. & Zhang, L., *Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(13): pp. 5207-5214.
- Li, P., Xiang, T., Li, H., Li, Q., Yang, B., Huang, J., Zhang, X., Shi, Y., Tan, J. & Ren, G., *Hyaluronan synthase 2 overexpression is correlated with the tumorigenesis and metastasis of human breast cancer*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. **8**(10): pp. 12101-12114.
- Lu, Y., Yeh, W. & Ohashi, P., *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. *Cytokine*, 2008. **42**(2): pp. 145-151.
- Masaki, I., Yonemitsu, Y., Yamashita, A., Sata, S., Tani, M., Komori, K., Nakagawa, K., Hou, X., Nagai, Y., Hasegawa, M., Sugimachi, K. & Sueishi, K., *Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2*. *Circ Res*, 2002. **90**(9): pp. 966-973.
- Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. *Science*, 2002. **296**(5566): pp. 301-305.
- Matzke, A., Sargsyan, V., Holtmann, B., Aramuni, G., Asan, E., Sendtner, M., Pace, G., Howells, N., Zhang, W., Ponta, H. & Orian-Rousseau, V., *Haploinsufficiency of c-Met in cd44^{-/-} mice identifies a collaboration of CD44 and c-Met in vivo*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(24): pp. 8797-8806.
- Meadows, K., Bryant, P. & Pumiglia, K., *Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(52): pp. 49289-49298.
- Melincovici, C., Boşca, A., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I., Roman, A. & Mişu, C., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis*. *Rom J Morphol Embryol*, 2018. **59**(2): pp. 455-467.
- Meves, S., Diehm, C., Berger, K., Pittrow, D., Trampisch, H., Burghaus, I., Tepohl, G., Allenberg, J., Endres, H., Schwertfeger, M., Darius, H., Haberl, R. & Group, G. S., *Peripheral arterial disease as an independent predictor for excess stroke morbidity and mortality in primary-care patients: 5-year results of the getABI study*. *Cerebrovasc Dis*, 2010. **29**(6): pp. 546-554.
- Meyer, K. & Palmer, J., *The Polysaccharide of the Vitreous Humor*. *Journal of Biological Chemistry*, 1934. **107**: pp. 629-634.
- Misra, S., Hascall, V., Markwald, R. & Ghatak, S., *Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer*. *Front Immunol*, 2015. **6**: pp. 201.
- Montesano, R., Kumar, S., Orci, L. & Pepper, M., *Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro*. *Laboratory investigation*, 1996. **75**(2): pp. 249-262.

- Nagy, N., Freudenberger, T., Melchior-Becker, A., Röck, K., Ter Braak, M., Jastrow, H., Kinzig, M., Lucke, S., Suvorava, T., Kojda, G., Weber, A., Levkau, B., Ergün, S. & Fischer, J., *Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis*. *Circulation*, 2010. **122**(22): pp. 2313-2322.
- Nieuwdorp, M., van Haeften, T., Gouverneur, M., Mooij, H., van Lieshout, M., Levi, M., Meijers, J., Holleman, F., Hoekstra, J., Vink, H., Kastelein, J. & Stroes, E., *Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo*. *Diabetes*, 2006. **55**(2): pp. 480-486.
- Niiyama, H., Huang, N., Rollins, M. & Cooke, J., *Murine model of hindlimb ischemia*. *J Vis Exp*, 2009. **23**: p. 1035.
- Noble, P., *Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair*. *Matrix Biol*, 2002. **21**(1): pp. 25-29.
- Pardue, E., Ibrahim, S. & Ramamurthi, A., *Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering*. *Organogenesis*, 2008. **4**(4): pp. 203-214.
- Park, D., Kim, Y., Kim, H., Kim, K., Lee, Y., Choe, J., Hahn, J., Lee, H., Jeon, J., Choi, C., YM, K. & Jeoung, D., *Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGF β receptor interaction via CD44-PKC δ* . *Molecules and Cells*, 2012. **33**(6): pp. 563-574.
- Petz, A., Grandoch, M., Gorski, D., Abrams, M., Piroth, M., Schneckmann, R., Homann, S., Müller, J., Hartwig, S., Lehr, S., Yamaguchi, Y., TN, W., Gorressen, S., Ding, Z., Kötter, S., Krüger, M., Heinen, A., Kelm, M., A, G., Flögel, U. & Fischer, J., *Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury*. *Circ Res*, 2019. **124**(10): pp. 1433-1447.
- Proebstl, D., Voisin, M., Woodfin, A., Whiteford, J., D'Acquisto, F., Jones, G., Rowe, D. & Nourshargh, S., *Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo*. *J Exp Med*, 2012. **209**(6): pp. 1219-1234.
- Qiang, B., Lim, S., Lekas, M., Kuliszewski, M., Wolff, R., Osherov, A., Rudenko, D., Leong-Poi, H., Noyan, H., Husain, M., Tran, K., Tryggvason, K., Hedin, U., Tran-Lundmark, K. & Strauss, B., *Perlecan heparan sulfate proteoglycan is a critical determinant of angiogenesis in response to mouse hind-limb ischemia*. *Can J Cardiol*, 2014. **30**(11): pp. 1444-1451.
- Ramirez, F. & Rifkin, D., *Matrix cell signaling events: a view from the matrix*. *Matrix Biol*, 2003. **22**(2): pp. 101-107.
- Rees, M., Hawkins, C. & Davies, M., *Hypochlorite and superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulphates*. *Biochem J*, 2004. **381**(Pt 1): pp. 175-184.
- Ross, R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. *Am Heart J*, 1999. **138**(5 Pt 2): pp. 419-420.
- Rother, S., Samsonov, S., Moeller, S., Schnabelrauch, M., Rademann, J., Blaszkiewicz, J., Köhling, S., Waltenberger, J., Pisabarro, M., Scharnweber, D. & Hintze, V., *Sulfated Hyaluronan Alters Endothelial Cell Activation in Vitro by Controlling the Biological Activity of the Angiogenic Factors Vascular Endothelial Growth Factor-A and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017. **9**(11): pp. 9539-9550.

- Roughley, P., Lamplugh, L., Lee, E., Matsumoto, K. & Yamaguchi, Y., *The role of hyaluronan produced by Has2 gene expression in development of the spine*. Spine (Phila Pa 1976), 2011. **36**(14): pp. E914-20.
- Roughley, P. & Mort, J., *The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage*. Journal of experimental orthopaedics, 2014. **1**(1): p. 8.
- Ruparelia, N., Chai, J., Fisher, E. & Choudhury, R., *Inflammatory processes in cardiovascular disease: a route to targeted therapies*. Nat Rev Cardiol, 2017. **14**(3): pp. 133-144.
- Sasaki, K., Murohara, T., Ikeda, H., Sugaya, T., Shimada, T., Shintani, S. & Imaizumi, T., *Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis*. J Clin Invest, 2002. **105**(5): pp. 603-611.
- Sato, T., Nakata, M., Torizuka, Y., Kishimoto, S. & Ishihara, M., *In vitro and in vivo gene delivery using chitosan/hyaluronic acid nanoparticles: Influences of molecular mass of hyaluronic acid and lyophilization on transfection efficiency*. J Gene Med, 2017. **19**(8).
- Savani, R., Cao, G., Pooler, P., Zaman, A., Zhou, Z. & DeLisser, H., *Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): pp. 36770-36778.
- Scheibner, K., Lutz, M., Boodoo, S., Fenton, M., Powell, J. & Horton, M., *Hyaluronan Fragments Act as an Endogenous Danger Signal by Engaging TLR2*. J Immunol, 2006. **177**(2): pp. 1272-1281.
- Schneckmann (geb. Schmetter), R., *Bedeutung der Hyaluronsäure-Synthase 3 für die Angiogenese und Arteriogenese* (Dissertation, Naturwissenschaften, aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf). 2018. Düsseldorf, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Seghers, L., de Vries, M., Pardali, E., Hoefler, I., Hierck, B., ten Dijke, P., Goumans, M. & Quax, P., *Shear induced collateral artery growth modulated by endoglin but not by ALK1*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2012. **16**(10): pp. 2440-2450.
- Senger, D., Galli, S., Dvorak, A., Perruzzi, C., Harvey, V. & Dvorak, H., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. **219**(4587): pp. 983-985.
- Shireman, P., *The chemokine system in arteriogenesis and hind limb ischemia*. J Vasc Surg, 2007. **45**(Suppl A): pp. A48-56.
- Silva, L., Pirraco, R., Santos, T., Novoa-Carballal, R., Cerqueira, M., Reis, R., Correlo, V. & Marques, A., *Neovascularization Induced by the Hyaluronic Acid-Based Spongy-Like Hydrogels Degradation Products*. ACS Appl Mater Interfaces, 2016. **8**(49): pp. 33464-33474.
- Skålén, K., Gustafsson, M., Rydberg, E., Hultén, L., Wiklund, O., Innerarity, T. & Borén, J., *Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis*. Nature, 2002. **417**(6890): pp. 750-754.
- Skalli, O., Pelte, M., Pecllet, M., Gabbiani, G., Gugliotta, P., Bussolati, G., Ravazzola, M. & Orci, L., *Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes*. J Histochem Cytochem, 1989. **37**(3): pp. 315-321.

- Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillessen, D. & Gabbiani, G., *A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation*. The Journal of Cell Biology, 1986. **103**: pp. 2787-2796.
- Slevin, M., Krupinski, J., Gaffney, J., Matou, S. W. & Savani, R. K., *Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways*. Matrix Biol, 2007. **26**(1): pp. 58-68.
- Smyth, L., Rustenhoven, J., Scotter, E., Schweder, P., Faull, R., Park, T. & Dragunow, M., *Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells*. J Chem Neuroanat, 2018. **92**: pp. 48-60.
- Spicer, A. & McDonald, J., *Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): pp. 1923-1932.
- Spicer, A. & Tien, J., *Hyaluronan and morphogenesis*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2004. **72**(1): pp. 89-108.
- Stern, R., *Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology*. Pathol Biol (Paris), 2005. **53**(7): pp. 372-382.
- Stern, R., Asari, A. & Sugahara, K., *Hyaluronan fragments: an information-rich system*. European journal of cell biology, 2006. **85**(8): pp. 699-715.
- Stern, R., Kogan, G., Jedrzejewski, M. & Soltés, L., *The many ways to cleave hyaluronan*. Biotechnol Adv, 2007. **25**(6): pp. 537-557.
- Sunabori, T., Koike, M., Asari, A., Oonuki, Y. & Uchiyama, Y., *Suppression of Ischemia-Induced Hippocampal Pyramidal Neuron Death by Hyaluronan Tetrasaccharide through Inhibition of Toll-Like Receptor 2 Signaling Pathway*. Am J Pathol, 2016. **186**(8): pp. 2143-2151.
- Sun, M., Puri, S., Mutoji, K., Coulson-Thomas, Y., Hascall, V., Jackson, D., Gesteira, T. & Coulson-Thomas, V., *Hyaluronan Derived From the Limbus is a Key Regulator of Corneal Lymphangiogenesis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019. **60**(4): pp. 1050-1062.
- Sussmann, M., Sarbia, M., Meyer-Kirchrath, J., Nüsing, R., Schrör, K. & Fischer, J., *Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins*. Circ Res, 2004. **94**(5): pp. 592-600.
- Takabe, P., Bart, G., Ropponen, A., Rilla, K., Tammi, M., Tammi, R. & Pasonen-Seppänen, S., *Hyaluronan synthase 3 (HAS3) overexpression downregulates MV3 melanoma cell proliferation, migration and adhesion*. Exp Cell Res, 2015. **337**(1): pp. 1-15.
- Tammi, M., Day, A. & Turley, E., *Hyaluronan and homeostasis: a balancing act*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): pp. 4581-4584.
- Tammi, R., MacCallum, D., Hascall, V., Pienimäki, J., Hyttinen, M. & Tammi, M., *Hyaluronan Bound to CD44 on Keratinocytes Is Displaced by Hyaluronan Decasaccharides and Not Hexasaccharides*. J Biol Chem, 1998. **273**(44): pp. 28878-28888.
- Tammi, R., Pasonen-Seppänen, S., Kolehmainen, E. & Tammi, M., *Hyaluronan synthase induction and hyaluronan accumulation in mouse epidermis following skin injury*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(5): pp. 898-905.
- Tang, Z., Liao, W., Tang, A., Tsai, S. & Hsieh, P., *The enhancement of endothelial cell therapy for angiogenesis in hindlimb ischemia using hyaluronan*. Biomaterials, 2011. **32**(1): pp. 75-86.

- Tang, T., Thompson, J., Wilson, P., Yoder, M., Müller, J., Fischer, J., Williams, K. & Tannock, L., *Biglycan deficiency: increased aortic aneurysm formation and lack of atheroprotection*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2014. **75**: pp. 174-180.
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C. & Simon, J., *Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4*. J Exp Med, 2002. **195**(1): pp. 99-111.
- Tesloianu, D., Morosanu, C., Roata, E. & Sorodoc, L., *Comparison Between Alprostadil and Iloprost in Intravenous Treatment of Patients With Chronic Peripheral Arterial Disease*. Maedica (Buchar), 2016. **11**(3): pp. 186-190.
- Thomas, K., *Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): pp. 603-606.
- Toole, B., Wight, T. & Tammy, M., *Hyaluronan-Cell Interactions in Cancer and Vascular Disease*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**: pp. 4593-4596.
- Tremmel, M., Matzke, A., Albrecht, I., Laib, A., Olaku, V., Ballmer-Hofer, K., Christofori, G., Héroult, M., Augustin, H., Ponta, H. & Orian-Rousseau, V., *A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis*. Blood, 2009. **114**(25): pp. 5239-5244.
- Triggs-Raine, B. & Natowicz, M., *Biology of hyaluronan: Insights from genetic disorders of hyaluronan metabolism*. World J Biol Chem, 2015. **6**(3): pp. 110-120.
- Tropès, I., Lamalle, L., Péoc'h, M., Farion, R., Usson, Y., Décorps, M. & Rémy, C., *In vivo assessment of tumoral angiogenesis*. Magn Reson Med, 2004. **51**(3): pp. 533-541.
- Turley, E., Noble, P. & Bourguignon, L., *Signaling properties of hyaluronan receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): pp. 4589-4592.
- van den Boom, M., Sarbia, M., von Wnuck Lipinski, K., Mann, P., Meyer-Kirchrath, J., Rauch, B., Grabitz, K., Levkau, B., Schrör, K. & Fischer, J., *Differential regulation of hyaluronic acid synthase isoforms in human saphenous vein smooth muscle cells: possible implications for vein graft stenosis*. Circ Res, 2006. **98**(1): pp. 36-44.
- Vigetti, D., Karousou, E., Viola, M., Deleonibus, S., De Luca, G. & Passi, A., *Hyaluronan: biosynthesis and signaling*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(8): pp. 2452-2459.
- Vlodavsky, I., Goldshmidt, O., Zcharia, E., Atzmon, R., Rangini-Guatta, Z., Elkin, M., Peretz, T. & Friedmann, Y., *Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development*. Seminars in Cancer Biology, 2002. **12**: pp. 121-129.
- Wang, G., de Vries, M., Sol, W., de Boer, H., van Zonneveld, A., Quax, P., Rabelink, T. & van den Berg, B., *Loss of Endothelial Glycocalyx Hyaluronan Impairs Endothelial Stability and Adaptive Vascular Remodeling After Arterial Ischemia*. Cells, 2020. **9**(4): p. E824.
- Wang, N., Liu, C., Wang, X., He, T., Li, L., Liang, X., Wang, L., Song, L., Wei, Y., Wu, Q. & Gong, C., *Hyaluronic Acid Oligosaccharides Improve Myocardial Function Reconstruction and Angiogenesis against Myocardial Infarction by Regulation of Macrophages*. Theranostics, 2019. **9**(7): pp. 1980-1992.
- Wang, J., Zohar, R. & McCulloch, C., *Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction*. Exp Cell Res, 2006. **312**(3): pp. 205-214.

- Welsch, U., *Lehrbuch der Histologie* (3. Ausg.). 2010. München, Elsevier.
- West, D., Hampson, I., Arnold, F. & Kumar, S., *Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid*. *Science*, 1985. **228**(4705): pp. 1324-1326.
- Wight, T., *Arterial remodeling in vascular disease: a key role for hyaluronan and versican*. *Front Biosci*, 2008. **13**: pp. 4933-4937.
- Wilkinson, T., Bressler, S., Evanko, S., Braun, K. & Wight, T., *Overexpression of hyaluronan synthases alters vascular smooth muscle cell phenotype and promotes monocyte adhesion*. *J Cell Physiol*, 2006. **206**(2): pp. 978-985.
- Yamamoto, H., Tobisawa, Y., Inubushi, T., Irie, F., Ohyama, C. & Yamaguchi, Y., *A mammalian homolog of the zebrafish transmembrane protein 2 (TMEM2) is the long-sought-after cell-surface hyaluronidase*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(18): pp. 7304-7311.
- Yamazaki, Y. & Morita, T., *Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors*. *Mol Divers*, 2006. **10**(4): pp. 515-527.
- Zhang, S., Chang, M., Zylka, D., Turley, S., Harrison, R. & Turley, E., *The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(18): pp. 11342-11348.
- Zhao, Y., He, Z., Gao, H., Tang, H., He, J., Guo, Q., Zhang, W. & Liu, J., *Fine Tuning of Core–Shell Structure of Hyaluronic Acid/Cell-Penetrating Peptides/siRNA Nanoparticles for Enhanced Gene Delivery to Macrophages in Antiatherosclerotic Therapy*. *Biomacromolecules*, 2018. **19**(7): pp. 2944-2956.