

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

**Untersuchung der basalen Kapillardichte und des
Hyaluronsäuregehalts in murinem Hinterlaufmuskelgewebe
bei Hyaluronsäuresynthase-3-Defizienz im Vergleich zu
Wildtyp-Kontrollen**

Dissertation

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

vorgelegt von
Christin Lorenz

2024

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock

Zweitgutachterin: PD Dr. med. Alexandra Ljimini

Es ist gut zu wissen, dass man eigentlich alles erreichen kann.
Man muss nur damit anfangen.

Julie Deane

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

Zusammenfassung

Eine Vielzahl von gesellschaftlich relevanten Erkrankungen begründet sich auf den Auswirkungen dysregulierter Angiogenese. Dabei nehmen sowohl die verminderte als auch die abnorm gesteigerte Gefäßneubildung eine tragende Rolle ein. Demnach zeigt eine reduzierte Durchblutung von Geweben direkte Folgen anhand von Krankheitsbildern wie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK), ischämischen Herzkrankheiten oder chronischen Wunden, wenn eine Kompensation nicht ausreichend erreicht werden kann. Hingegen findet sich eine gesteigerte Gefäßneubildung bei inflammatorischen Prozessen und Tumorerkrankungen. Um diesen komplexen Erkrankungsformen mit effektiven therapeutischen Maßnahmen begegnen zu können, bedarf es eines umfangreichen Verständnisses der physiologischen und pathophysiologischen Abläufe der Angiogenese.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass Hyaluronsäure maßgeblich an angiogenen Vorgängen beteiligt ist, stellt sie einen interessanten Forschungsansatz im Hinblick auf die Einflussfaktoren einer dysregulierten Angiogenese dar. Hyaluronsäure ist ein ubiquitär vorkommendes großmolekulares Glykosaminoglykan, das je nach Länge seiner Disaccharid-Ketten sowie der Art seiner Bindungspartner sowohl pro- als auch anti-angiogene Effekte zeigt.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung der kongenitalen Hyaluronsäuresynthase 3-Defizienz (*Has3*-Defizienz) auf die basale, nicht pathologisch veränderte Gefäßsituation in adulten Mäusen untersucht. Dabei wurde auf präliminäre, institutsinterne Daten zur Rekonstituierung des Blutflusses nach induzierter Hinterlaufischämie bei *Has3*-defizienten Mäusen Bezug genommen. Es ergab sich die Fragestellung, ob sich unabhängig von pathophysiologischen Vorgängen bereits durch die kongenitale *Has3*-Defizienz Veränderungen in der Gefäßdichte und folglich in der Durchblutungssituation zeigen.

Zu diesem Zweck wurde die Hinterlaufmuskulatur von 16-20 Wochen alten, männlichen Mäusen in Form von Kryo-Präparaten anhand histologischer Schnitte strukturiert untersucht und eine Expressionsanalyse Hyaluronsäure-assoziiierter Gene durchgeführt. Als Parameter der histologischen Auswertungen wurden die

Kapillardichte und Muskelfibrillenanzahl sowie der perifibrilläre Hyaluronsäuregehalt ermittelt. In der Analyse der genetischen Expression wurden die Hyaluronsäuresynthasen 1-3, die Hyaluronsäurerezeptoren *Cd44* und *Rhamm* sowie die Hyaluronidasen 1 und 2 bestimmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich kein Unterschied in der Anzahl der Kapillaren zwischen den *Has3-knockout* Mäusen und den Wildtyp-Kontrollen ergab. Auch das Verhältnis der Anzahl von Kapillaren zu Muskelfibrillen wies keine Differenz zwischen den untersuchten Gruppen auf. Es zeigten sich regionale quantitative Unterschiede (innerhalb der horizontalen Ebene) gleichermaßen bei den *Has3*-defizienten Mäusen als auch in den Kontrollen, die es für weitere Auswertungen und Untersuchungen zu berücksichtigen gilt.

Erhobene Daten zur extrazellulären Hyaluronsäureverteilung der histologischen Proben ergaben Hinweise auf ein signifikant vermehrtes Vorliegen von HA bei den *Has3-knockout*-Mäusen. Die überdies durchgeführte RNA-Expressionsanalyse bestätigte den kongenitalen *Has3-knockout* und wies zudem eine verminderte mRNA-Expression der *Has2*, der *Hyal1* sowie *Cd44* auf.

Weitere Untersuchungen zur Validierung der HA-Quantität sind für Folgearbeiten zu diskutieren. Gegenwärtig ist anzunehmen, dass es aufgrund einer geringeren *Hyal1*-Expression zu einer verminderten Degradation der vorliegenden HA kommen könnte.

Die mit dieser Arbeit erhobenen Daten zur Quantität der Gefäße untermauert, dass der kongenitale *Has3-knockout* keine Veränderungen in der basalen Gefäßdichte hervorruft. Somit konnte bewiesen werden, dass es unter nicht pathologisch veränderten Bedingungen keine Abweichung bei der Kapillarisation gibt. Dies stützt die These von Folgearbeiten, dass der angiogene Effekt von HA erst unter pathophysiologischen Vorgängen (bezugnehmend auf die induzierte Hinterlaufischämie) eintritt.

Summary

A variety of socially relevant diseases are based on the effects of dysregulated angiogenesis. Both the reduced and the abnormally increased formation of new blood vessels play a major role. According to this, a reduced blood flow in tissues shows direct consequences in clinical conditions such as peripheral arterial disease (PAD), ischemic heart diseases or chronic wounds, if sufficient compensation cannot be achieved. On the other hand, there is increased formation of new blood vessels in inflammatory processes and tumor diseases. To be able to counteract these complex forms of the disease with effective therapeutic strategies, a comprehensive understanding of the physiological and pathophysiological processes of angiogenesis is required.

Since hyaluronic acid has been shown to play a vital role in angiogenic processes, it represents an interesting research approach to the factors influencing dysregulated angiogenesis. Hyaluronic acid is a ubiquitous large-molecule glycosaminoglycan, which shows both pro- and anti-angiogenic effects depending on the length of its disaccharide chains and binding partners.

In this study, the impact of congenital hyaluronic acid synthase 3 deficiency (*Has3*-deficiency) on the basal, non-pathologically altered vascular situation in adult mice was investigated. Reference was made to preliminary, internal institute data on the reconstitution of blood flow after induced hindlimb ischemia in *Has3*-deficient mice. The question arose as to whether changes in vascular density and consequently in the blood flow situation are already evident because of congenital *Has3*-deficiency, irrespective of pathophysiological processes.

For this purpose, the hind leg muscles of 16-20-week-old male mice were examined in a structured manner in the form of cryo-preparations using histological sections and an expression analysis of hyaluronic acid-associated genes was carried out. The capillary density and number of muscle fibrils as well as the perifibrillar hyaluronic acid content were determined as parameters of the histological evaluations. In the analysis of the genetic expression, the hyaluronic acid synthases, the hyaluronic acid receptors *Cd44* and *Rhamm* as well as the hyaluronidases 1 and 2 were determined. In summary, there was no difference in the number of capillaries between the *Has3*-knockout mice and the wild-type controls. The ratio of the number of capillaries to muscle fibrils also showed no difference between the groups examined. There were

regional quantitative differences (within the horizontal plane) both in the *Has3*-deficient mice and in the controls, which need to be considered for further analysis and studies.

Data collected on the extracellular hyaluronic acid distribution of the histological samples indicated a significantly increased presence of HA in the *Has3*-knockout mice. Moreover, RNA expression analysis confirmed the congenital *Has3*-knockout and showed reduced mRNA expression of *Has2*, *Hyal1* and *Cd44*.

Further investigations to validate the HA quantity are to be discussed for follow-up work. At present, it can be assumed that lower *Hyal1* expression could lead to reduced degradation of the HA present.

The data collected in this study on the quantity of vessels confirms that the congenital *Has3*-knockout does not cause any changes in basal vessel density. Thus, it could be proven that there is no deviation in capillarization under non-pathologically altered conditions. This supports the thesis of subsequent studies that the angiogenic effect of HA only occurs under pathophysiological processes (in relation to the induced hind leg ischaemia).

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Angiogenese	3
1.2.1 Definition und Varianten	3
1.2.2 Stimuli und Signalmoleküle der Angiogenese	5
1.2.3 Krankheitsbilder aufgrund dysregulierter Angiogenese	6
1.2.4 Wandbau von Blutgefäßen.....	7
1.3 Hyaluronsäure	9
1.3.1 Molekülstruktur, Synthese und Abbau von Hyaluronsäure	9
1.3.2 Hyaluronsäure als Bestandteil der Extrazellulärmatrix	10
1.3.3 Funktionen der Hyaluronsäurevarianten	11
1.3.4 Bindungspartner der Hyaluronsäure	12
1.3.5 Stimulation und Inhibition der Hyaluronsäuresynthese	14
1.4 Induzierte Hyaluronsäure-Defizienz	15
1.5 Ziel der Arbeit	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Verwendete Arbeitsmittel	18
2.2 Allgemeines zum histologischen Arbeitsteil.....	20
2.2.1 Rahmenbedingungen	20
2.2.2 Entnahme und Aufbereitung des murinen Hinterlaufmuskels	21
2.2.3 Gefrierschnitte.....	22
2.3 Färbungen.....	23
2.3.1 Allgemeines	23
2.3.2 Hämalun-Eosin-Färbung	24

2.3.3	CD31/ α -smooth-muscle-actin-Doppelfärbung.....	25
2.3.4	Hyaluronsäure-Färbung.....	27
2.3.5	CD44-Färbung.....	28
2.3.6	RHAMM	29
2.4	Mikroskopie und Bildverarbeitung.....	29
2.4.1	Hard- und Software	29
2.4.2	Anatomische Unterteilung	30
2.4.3	Bestimmung der basalen Kapillar- und Muskelfibrillenanzahl.....	30
2.4.4	Bestimmung des Hyaluronsäuregehalts.....	33
2.4.5	Evaluation Verteilung der Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM...	33
2.5	Analyse der Genexpression	34
2.5.1	Isolation der Boten-Ribonukleinsäure und reverse Transkription	34
2.5.2	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	35
2.6	Statistik	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Quantifizierung der Kapillardichte und Muskelfibrillenanzahl	37
3.1.1	Vergleich der Kapillaranzahl des linken und rechten Hinterlaufs	37
3.1.2	Detaillierte Untersuchung der Kapillaranzahl und -verteilung	38
3.1.3	Detaillierte Untersuchung der Muskelfibrillenanzahl und -verteilung	42
3.1.4	Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfibrillen.....	44
3.2	Quantifizierung der Hyaluronsäure	46
3.3	Verteilung der Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM.....	48
3.4	RNA-Expression Hyaluronsäure-assoziiierter Gene	49
4	Diskussion	50
4.1	Einordnung der Ergebnisse.....	50
4.1.1	Quantität der Kapillaren und Muskelfibrillen	50
4.1.2	Nachweis der HA-Bindungspartner CD44 und RHAMM.....	52
4.1.3	Quantitative Auswertung der Hyaluronsäure-Menge	53
4.2	Limitationen.....	55
4.2.1	Tiermodell.....	55
4.2.2	Probenumfang.....	55
4.2.3	Vergleichbarkeit	55

4.3	Fazit und Ausblick	56
5	Appendix.....	58
5.1	Statistiken	58
5.2	Herstellerverzeichnis	59
5.3	Additive Färbungen	59
5.3.1	CD45-Färbung.....	60
5.3.2	Mac-2-Färbung	60
5.3.3	Isolectin/CD45/Mac2-Dreifachfärbung	60
5.3.4	CD31/HA-Doppelfärbung	61
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	a

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Angiogenese	4
Abbildung 2: Gefäßwandbau und -diameter	7
Abbildung 3: Perizytenverteilung	8
Abbildung 4: Strukturformel der Hyaluronsäure	9
Abbildung 5: Referenzstrukturen vordefinierter Ebenen	23
Abbildung 6: Repräsentatives Bild einer Hämalaun-Eosin-Färbung	25
Abbildung 7: Repräsentatives Bild der CD31/ <i>α-smooth-muscle-actin</i> - Doppelfärbung	26
Abbildung 8: Repräsentatives Bild der Hyaluronsäure-Färbung	28
Abbildung 9: Anatomische Unterteilung der Abschnitte I-IX	30
Abbildung 10: Automatische Auszählung der Kapillaren	31
Abbildung 11: Manuelle Auszählung der Kapillaren und Muskelfibrillen	32
Abbildung 12: Größenverhältnisse der Blutgefäße im murinen Hinterlauf	32
Abbildung 13: Quantifizierung der perifibrillären Hyaluronsäure	33
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung einer CD44-Färbung	34
Abbildung 15: Vergleich der gemittelten Kapillaranzahl des linken und rechten Hinterlaufs	37
Abbildung 16: Vergleich gemittelte Muskelfibrillenanzahl des linken und rechten Hinterlaufs	38
Abbildung 17: Quantifizierung der Kapillaranzahl in Hinterlaufmuskelgewebe von <i>Has3-knockout</i> -Mäusen und Wildtypkontrollen	39
Abbildung 18: Vergleich von manueller und automatisierter Erfassung der Kapillaranzahl	40
Abbildung 19: Quantifizierung der Kapillaren anhand der CD31-positiv markierten Fläche	41
Abbildung 20: Quantifizierung der Kapillaren innerhalb der horizontalen Ebene ..	42
Abbildung 21: Verteilung der Muskelfibrillen	43
Abbildung 22: Verteilungsverhalten der Kapillaren und Muskelfibrillen auf horizontaler Ebene	44
Abbildung 23: Kapillaren/Muskelfibrillen-Quotient	45
Abbildung 24: Quantifizierung des perifibrillären Hyaluronsäuregehalts	46
Abbildung 25: Verteilung der Hyaluronsäure auf horizontaler Ebene	47
Abbildung 26: Vergleich des quantitativen Verteilungsverhaltens auf horizontaler Ebene von Kapillaren, Muskelfibrillen und HA	48

Abbildung 27: RNA-Expression Hyaluronsäure-assoziiierter Gene in muriner Hinterlauf-muskulatur.....	49
--	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Induzierte Signalwege durch Bindung von Hyaluronsäure an CD44	13
Tabelle 2: Induzierte Signalwege durch Bindung von Hyaluronsäure an RHAMM .	14
Tabelle 3: Geräte.....	18
Tabelle 4: Materialien	18
Tabelle 5: Substanzen	18
Tabelle 6: Puffer und Lösungen	19
Tabelle 7: Primär-Antikörper und Bindeproteine	20
Tabelle 8: Sekundär-Antikörper	20
Tabelle 9: Primer und Primersequenzen	35

Abkürzungsverzeichnis

Ang2	Angiopoietin-2
Aqua dest.	Aqua destillata; destilliertes Wasser
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BG	Bindegewebe
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Differenzierungseinheit)
CD31	<i>Cluster of Differentiation 31</i> (entspricht Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül; <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i> (PECAM-1))
CD44	<i>Cluster of Differentiation 44</i> (Hyaluronsäurerezeptor)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i> (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
c-Src	<i>cellular Src</i> (Tyrosinkinase) (Akronym aus <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i>)
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Ebene
EC	<i>Endothelial Cells</i> (Endothelzellen)
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> (Extrazellulärmatrix)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EPC	<i>Endothelial Progenitor Cells</i> (endotheliale Progenitorzellen)
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i> (Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase)
ERM	Ezrin-Radixin-Morsin-Proteine
EtOH	Ethanol
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i> (fokale Adhäsionskinase)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fetales Kälberserum)
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GAG	Glykosaminoglykan
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GlcA	Glucuronsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	<i>Hyaluronic Acid; hyaluronan</i> (Hyaluronsäure)
HABP	<i>Hyaluronic Acid Binding Protein</i> (Hyaluronsäure-Bindeprotein)
HAS	humane Hyaluronsäuresynthase
HAS	murine Hyaluronsäuresynthase
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HMW-HA	<i>High Molecular Weight Hyaluronic Acid</i> (hochmolekulare Hyaluronsäure)
HYAL1-4	humane Hyaluronidase 1-4
I.E.	Internationale Einheit
i.p	intraperitoneal
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> (interzelluläres Adhäsionsmolekül 1)

KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	<i>Knock-Out</i> (gezielte Deaktivierung eines bestimmten Gens)
LMW-HA	<i>Low Molecular Weight Hyaluronic Acid</i> (niedermolekulare Hyaluronsäure)
LYVE-1	<i>lymphatic vessel hyaluronic acid receptor 1</i> (Endothelialer Hyaluronsäurerezeptor 1 der Lymphgefäße)
M.	Musculus
MF	Muskelfibrille(n)
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MW	<i>molecular weight</i> (Molekülmasse)
n	Anzahl
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nHA	<i>native Hyaluronic Acid</i> (native Hyaluronsäure)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
oHA	<i>oligomers of hyaluronic acid</i> (oligomere Hyaluronsäure)
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Phosphatpuffer; phosphatgepufferte Salzlösung)
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i>
PH-20/SPAM1	<i>Sperm surface protein PH-20; Sperm Adhesion Molecule 1</i> (SPAM1)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Protein Kinase C
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (quantitative Polymerasekettenreaktion)
Rac1	<i>Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1</i>
Ras	Proto-Onkogen (Akronym aus rat und sarcoma)
RHAMM	<i>Receptor for Hyaluronan Mediated Motility; Hyaluronan Mediated Motility Receptor</i> ; CD168 (Hyaluronsäurerezeptor)
RhoA	kleines GTPase Protein
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung vom Mittelwert
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SMC	<i>smooth muscle cells</i> (glatte Muskelzellen)
TB	<i>Tris-Buffer</i> (Tris-Puffer)
TBS	<i>Tris-Buffered-Saline</i> (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
Tie-2	<i>Tyrosine-protein kinase receptor type II</i>

TIMP-3	<i>Metalloproteinase inhibitor 3</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose Faktor- α
TSG-6	<i>Tumor necrosis factor-Stimulated Gene-6</i>
TSP-1	Thrombospondin-1
UDP	Uridindiphosphat
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (vaskulärer Endothelwachstumsfaktor)
WT	Wildtyp-Kontrolle
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
α SMA	<i>α smooth muscle actin</i> (glattes Muskel-Aktin α)

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Aufrechterhaltung von Gewebefunktionen ist maßgeblich von der Durchblutung und der damit verbundenen Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen sowie dem Abtransport von Metaboliten abhängig. Der Organismus ist unter physiologischen Bedingungen in der Lage, ein Ungleichgewicht in der Versorgung der Zellen zu detektieren und Vorgänge zu initiieren, um die Balance aufrechtzuerhalten bzw. wiederherzustellen. Bei der Vermehrung von Gewebe (im adulten Organismus), beispielsweise aufgrund von Muskelaufbau oder Fettgewebszunahme, wird die Blutversorgung unter anderem durch eine Vergrößerung des kapillaren Netzwerks sichergestellt. *Vice versa* wird bei Verminderung des zu versorgenden Gewebes eine Regression der Gefäßanzahl beschrieben.¹ Auch bei der Wundheilung oder Änderungen eines funktionalen Zustands wie bei der Ausreifung des Gelbkörpers während des weiblichen Zyklus finden diese physiologischen Vorgänge statt.^{2,3} Auf diese Weise wird die Größe des Gefäßbetts den Bedürfnissen des jeweiligen Gewebes angepasst.

Es kann aufgrund pathophysiologischer Prozesse dazu kommen, dass die Gewebepfusion nicht ausreichend aufrechterhalten werden kann. Funktionseinschränkungen und/oder -verlust bis hin zum Zelluntergang sind die Folge. Klinisch zeigen sich diese Vorgänge in Krankheitsbildern wie der ischämischen Herzkrankheit, die sowohl bei den Hospitalisierungsursachen als auch in der Todesursachenstatistik in Deutschland einen erheblichen Stellenwert einnimmt. Im Jahr 2020 wurden 121.462 Todesfälle im unmittelbaren Zusammenhang mit kardiovaskulären Durchblutungsstörungen verzeichnet. Auch zerebrovaskuläre Krankheiten mit 53.308 Verstorbenen, der akute Myokardinfarkt mit 44.529 Sterbefällen sowie letale Verläufe von Krankheiten der Arterien, Arteriolen und Kapillaren mit 11.890 Fällen im gleichen Jahr verdeutlichen das Ausmaß dieser Pathologien (siehe Tabelle A 1 und Tabelle A 2 im Appendix).⁴ Ein weiteres Beispiel über die relevanten Auswirkungen von Durchblutungsstörungen zeigt sich in Zusammenhang mit der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK). Aufgrund vielfältiger Ursachen, zumeist aber durch arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen, kann es zu einer graduellen Stenose bis hin zur vollständigen Okklusion mit resultierender Minderperfusion im Versorgungsgebiet

einer betroffenen Arterie vorwiegend der unteren Extremitäten kommen. Trotz körpereigener Kompensationsmechanismen kann die Durchblutung oft nicht ausreichend wiederhergestellt werden.⁵ Die Folgen variieren je nach Ausprägung des Verschlusses von einer verminderten Belastbarkeit und Schmerzen über Hautulzerationen bis hin zum Verlust einer Extremität und gehen mit einer erhöhten Hospitalisierungs- und Sterberate einher.⁶ Ein Großteil der Betroffenen bleibt jedoch lange asymptomatisch und damit häufig unterdiagnostiziert.⁷ Dieser Großteil weist allerdings eine erhöhte Disposition zu kardiovaskulären und zerebrovaskulären Ereignissen auf.⁸ In Anbetracht der Gesamtprävalenz von 3-10 % der Gesamtbevölkerung, mit einer drastischen Zunahme in der Gruppe der über 70-Jährigen auf 15-20 %, ist die pAVK und deren Therapie hinsichtlich der demografischen Entwicklung von großem gesellschaftlichen aber auch ökonomischen Interesse.⁹ Bisherige Behandlungsstrategien verfolgen das primäre Ziel der Symptomlinderung und Vermeidung des Stenosierungsprogresses. Dabei kommen konservative Verfahren wie Gehtraining, medikamentöse Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern und vasoaktiven Substanzen, aber auch invasive Methoden in fortgeschrittenen Stadien, zum Einsatz. Invasive Methoden beinhalten die Revaskularisierung des stenosierten Gefäßes oder das Anlegen von Bypässen.¹⁰ Die endogene Gefäßneubildung im ischämischen Areal anzuregen und auf diese Weise die enormen Auswirkungen der Folgeschäden geringzuhalten, stellt möglicherweise einen weiteren therapeutischen Zweig im Rahmen einer Sekundärprophylaxe dar. Da allerdings viele Mechanismen der Gefäßneubildung noch unzureichend verstanden sind, beschäftigt sich diese Arbeit mit einem Teilgebiet des Einflusses der extrazellulären Hyaluronsäure auf die Angiogenese.

1.2 Angiogenese

1.2.1 Definition und Varianten

Der Begriff Angiogenese, aus dem griechischen „Gefäß“ und „Entstehung“, beschreibt die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden. Abzugrenzen ist die Angiogenese von der Vaskulogenese und der Arteriogenese. Die Vaskulogenese läuft im Rahmen der *de novo* Gefäßentstehung überwiegend während der Embryonalentwicklung ab. Dabei findet eine Differenzierung von mesodermalen Stammzellen über Angioblasten zu Endothelzellen (EC) statt, aus denen das Gefäßsystem konstruiert wird.¹¹ Die Arteriogenese hingegen beschreibt die Entstehung von Arterien aus bereits vorhandenen Gefäßen durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Proliferation beziehungsweise Rekrutierung von glatten Muskelzellen und Perizyten in die Gefäßwand. Scherstress wird hier als entscheidender Reiz angesehen.¹²

Bei der Angiogenese werden verschiedene Varianten beschrieben, die zum Ausbau eines komplexen Kapillarnetzwerkes führen. Laut Carmeliet *et al.* wird die aussprossende (*sprouting*) Form allerdings am häufigsten nachgewiesen.¹³ Diese wird zumeist infolge einer hypoxischen, entzündlichen oder tumorös veränderten Gewebesituation initiiert, da pro-angiogene Wachstumsfaktoren von den Zellen des betroffenen Areals freigesetzt werden. Es kommt nach Vasodilatation zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität und folglich zu vermehrter Extravasation von Plasmaproteinen.¹⁴ Durch Degradation der Basalmembran der Gefäße und Ablösen aus dem Zellverband, werden die Endothelzellen (EC) zur Migration und Proliferation befähigt, wie Abbildung 1 darstellt. Infolgedessen formiert sich ein Gefäßspross, ausgerichtet an einer führenden Endothelzelle, der sogenannten *tip cell*, in Richtung der höchsten Konzentration der ausgeschütteten Wachstumsfaktoren. Lokale Umbauprozesse in der Extrazellulärmatrix (ECM) schaffen dabei eine Leitstruktur. Die aufeinander zuwachsenden, neu formierten Gefäßäste fusionieren miteinander zu einer Schlinge und können auf diese Weise eine Versorgungslücke im Kapillarbett schließen. Für die Entstehung optimaler Flussbedingungen spielt die Wirkung von Scherkräften an Endothelzellen eine entscheidende Rolle.¹⁵ Dabei zeigt sich, dass Gefäße, die nach Zusammenschluss nicht perfundiert werden, regredieren. Erst die Stabilisierung der Endothelzellen

durch Anlagerung von Perizyten und die erneute Schaffung einer intakten Basalmembran führt zur Ausreifung und vollständigen Funktionsfähigkeit.¹³

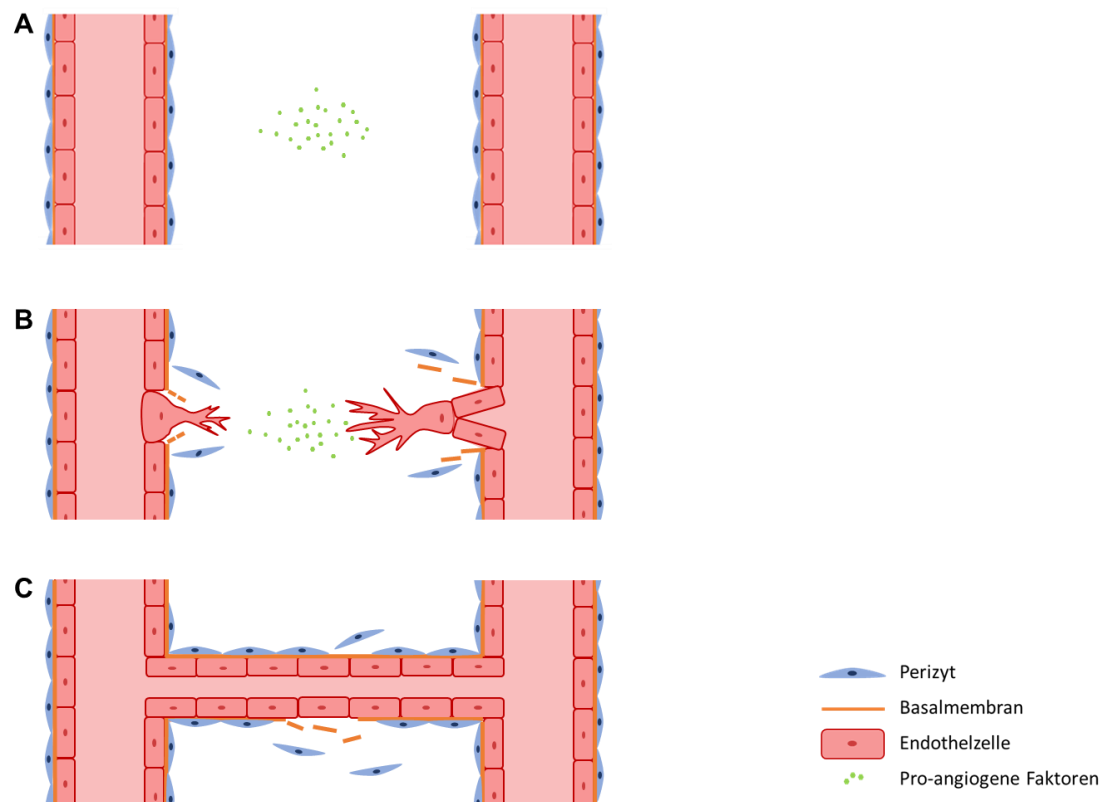


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Angiogenese

Bereits bestehende Blutgefäße (A) beginnen entlang einer führenden *tip*-Zelle in Richtung pro-angiogener Faktoren auszusprossen (B) und fusionieren zu einem neuen Gefäß, (C) das durch die Basalmembran und Anlagerung von Perizyten stabilisiert und voll funktionsfähig wird.

Eine weitere Form der Angiogenese ist die von Burri *et al.* 1986 zuerst definierte intussuszeptive Form. Diese scheint, im Gegensatz zur aussprossenden Variante, binnen Stunden abzulaufen und vor allem bei der Ausreifung von Geweben eine Rolle zu spielen. Dabei kommt es über eine Reorganisation von Endothelzellen sowie Fibroblasten und Perizyten zur Teilung eines Gefäßabschnitts, ohne dass dabei primär Zellen proliferieren. Elektronenmikroskopisch betrachtet, stellt sich dieser Prozess als Einstülpung/Intussuszeption in das Lumen der Kapillare beziehungsweise als säulenartige Formierung dar.¹⁶

Eine andere Variante der Angiogenese, wie sie auch von Carmeliet *et al.* beschrieben wurde, ist die Aufspaltung vorhandener Gefäße nach Bildung intraluminaler Endothelzellbrücken.¹³

In der Forschung für diese Arbeit wird der aussprossenden Form die größte Bedeutung und Aufmerksamkeit beigemessen.

Der Einfluss von endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus dem Knochenmark auf die Gefäßneubildung ist noch nicht abschließend geklärt. Die EPC nehmen bei der Vaskulogenese während der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle ein, konnten aber auch im peripheren Blut bei Erwachsenen nachgewiesen werden.¹⁷ Aktuelle Studien untersuchen, in welchem Ausmaß die EPC Einfluss auf die Gefäßneubildung nehmen und wie sich ihre Wirkung von der der ausgereiften EC abgrenzen lässt.

1.2.2 Stimuli und Signalmoleküle der Angiogenese

Unter physiologischen Bedingungen steht die Ausschüttung pro- und anti-angiogener Signalmoleküle in einem ausbalancierten Gleichgewicht und dient primär der Aufrechterhaltung des Zellumsatzes und der Gewebekomöostase.¹⁸ Dieses Gleichgewicht kann sich zugunsten der pro-angiogenen Wirkweise verlagern, wenn Stimuli wie eine Hypoxie oder Inflammation in einem Gewebe vorliegen.¹⁹

Demnach sind Endothelzellen in der Lage, den Sauerstoffgehalt zu detektieren und bei einer Hypoxie über die Stabilisierung des *Hypoxia inducible factors* (HIF) die Ausschüttung von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) anzuregen und somit die Angiogenese zu stimulieren.^{20,21} Zur VEGF-Familie zählen unterschiedliche Subtypen wie VEGF-A-F und der *Placental growth factor* (PlGF), die charakteristischerweise an den VEGF-Rezeptoren 1-3 eine Signaltransduktion initiieren.²² Dem Subtyp VEGF-A kommt dabei die größte Bedeutung zu.²³ Er regt die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) zu vermehrter Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) an und führt auf diesem Wege zur Vasodilatation. Darüber hinaus erhöht VEGF die Permeabilität von Endothelzellen und begünstigt die Extravasation von Plasmaproteinen.²⁴ Zudem stimuliert VEGF-A die Leukozytenadhäsion und kann, in Verbindung mit weiteren Proteinen, Endothelzellen zur Proliferation und Migration befähigen. Eines dieser Proteine ist Angiopoietin-2 (Ang2), das unter anderem auch die Degradation der Basalmembran einleitet.²⁵ Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Plasminaktivatoren bahnen einen Weg für die

migrierenden Endothelzellen, in dem sie Proteine und Polysaccharide in der Extrazellulärmatrix aufspalten.²⁶ Bei der Stabilisierung der neu entstandenen Gefäße durch Anlagerung von glatten Muskelzellen (SMC) und Perizyten nehmen der *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) und der zugehörige Rezeptor (PDGFR) eine tragende Rolle ein. Nicht-endothelzellspezifische Chemokine leisten ihren Beitrag über die Rekrutierung pro-angiogener Immunzellen und endothelialer Progenitorzellen.²⁷

Die Mechanismen, die der *Fibroblast Growth Factor* (FGF) initiiert, sind noch nicht abschließend geklärt, allerdings wird eine übergeordnete Funktion in der Regulation verschiedener spezialisierter Wachstumsfaktoren in Bezug auf die Angio- und Arteriogenese diskutiert.²⁸ Im inflammatorischen Geschehen spielt vor allem die Sekretion von Signalmolekülen durch Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und weiteren Entzündungszellen eine wesentliche Rolle.^{29,30} Die Effekte, die sich aus der Infiltration von Immunzellen oder der Hypoxie ergeben, finden sich auch beim Tumorwachstum aufgrund des erhöhten Zellumsatzes wieder. Hier kommen gegebenenfalls genetische Mutationen hinzu, die die Ausschüttung der pro-angiogenen Signalmoleküle hochregulieren können.³¹

1.2.3 Krankheitsbilder aufgrund dysregulierter Angiogenese

Eine Dysregulation der Angiogenese kann zu einer Vielzahl von malignen, ischämischen, inflammatorischen und immunologischen Störungen führen und diverse Organsysteme betreffen.

Carmeliet *et al.* beschreiben pathophysiologische Veränderungen wie die diabetische Retinopathie, Endometriose, Arthritis oder Psoriasis, die durch eine übermäßige Angiogenese, beispielsweise bei gesteigerter Ausschüttung von Wachstumsfaktoren in Erscheinung treten. Darüber hinaus kann auch eine vermehrte Expression angiogener Gene, wie bei Tumorerkrankungen, zu einer lokal gesteigerten Gefäßbildung führen. Umgekehrt zeigt sich eine insuffiziente Angiogenese, z.B. durch eine fehlende Induktion bei vermindert vorliegendem VEGF, in Krankheitsbildern wie der Lungenfibrose (bei gesteigerter EC-Apoptose) oder der Osteoporose. Zudem werden Krankheitsbilder wie die Arteriopathie, Nephropathie oder eine gestörte Wundheilung, insbesondere im Rahmen

altersabhängiger Störungen physiologischer Abläufe bei der Angiogenese, beschrieben.³²

1.2.4 Wandbau von Blutgefäßen

Im Folgenden sind Blutgefäße schematisch im Hinblick auf ihre Architektur dargestellt.

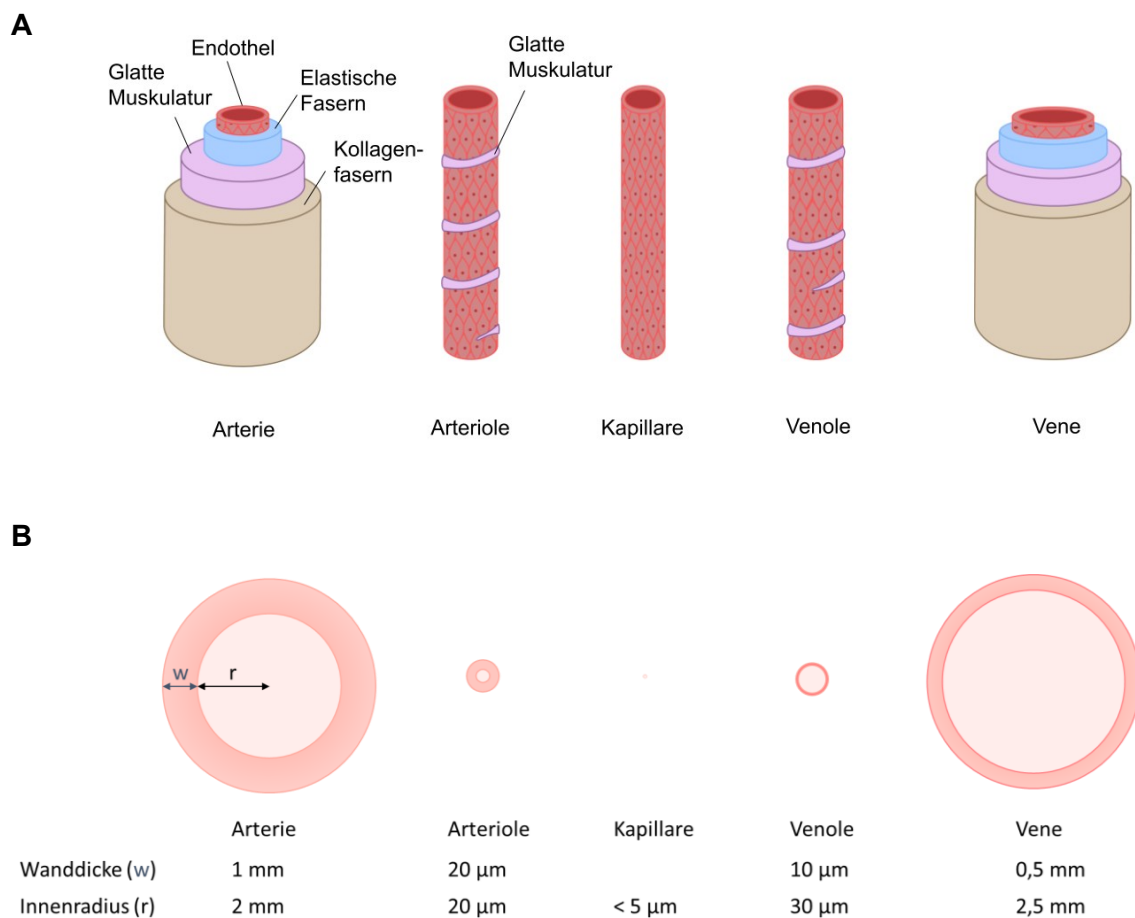


Abbildung 2: Gefäßwandbau und -diameter

Dargestellt ist eine schematische Zeichnung des Gefäßwandbaus (**A**) und des Gefäßdiameter (**B**) anhand der Wanddicke (w) und des Innenradius (r) für Arterie, Arteriole, Kapillare, Venole und Vene.

Wie in Abbildung 2 dargestellt ist, weisen Blutgefäße, je nach physiologischen Eigenschaften, insbesondere der tangentialen Wandspannung und Elastizität, eine unterschiedliche Wandschichtung auf. Entsprechend des erhöhten intravasalen

Drucks sind Arterien und Arteriolen mit einer kräftigen Muskelwandschicht ausgestattet.

Die Wände des venösen Systems weisen im Vergleich zu Arterien eine dünnere Muskelschicht und einen höheren Anteil an elastischen Fasern auf. Da der venöse Blutdruck geringer ist, wird im venösen System keine vergleichbar dicke Muskelschicht benötigt. Zudem weist das venöse System einen größeren Gefäßdurchmesser auf.

Kapillaren bestehen lediglich aus einer einfachen Endothelzellschicht, die von der Basalmembran umgeben ist. Im Mittel beträgt der Kapillardurchmesser 5-10 μm .³³ Dieser Wandaufbau ermöglicht den Austausch von Gasen und Stoffen.

Überdies sind Perizyten an kleineren Gefäße, insbesondere Arteriolen, Kapillaren und Venolen angelagert, wie Abbildung 3 zeigt. Mit ihren zytoplasmatischen Zellausläufern überdecken sie in unterschiedlicher Dichte die Endothelzellen. Ihre Funktion ist noch nicht abschließend geklärt; die gefäßstabilisierende Komponente und Einflussnahme auf die Gefäßpermeabilität scheinen führend zu sein, aber auch Auswirkungen auf die Angiogenese und die Leukozytenmigration werden beschrieben.^{34, 35}

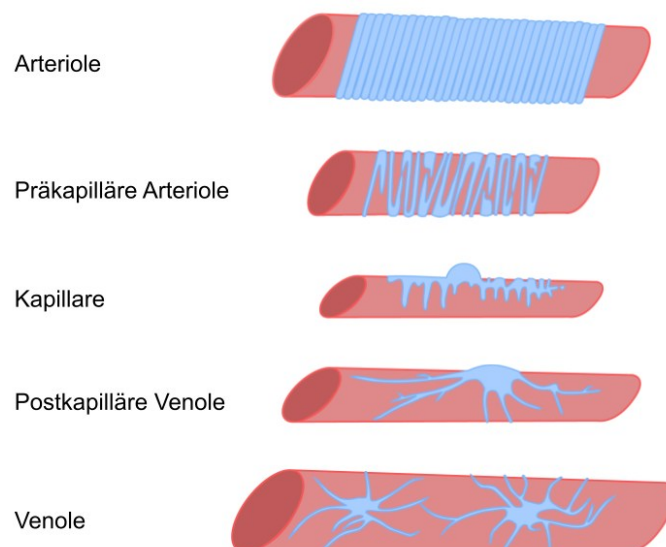


Abbildung 3: Perizytenverteilung

Dargestellt ist die Anlagerung und Verteilung von Perizyten (blau) auf Arteriolen, Kapillaren und Venolen. Die quantitative Anlagerung nimmt von den Arteriolen hin zu den Venolen ab.

1.3 Hyaluronsäure

1.3.1 Molekülstruktur, Synthese und Abbau von Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA) stellt eine besondere Komponente der Extrazellulärmatrix (ECM) dar. Das sulfatfreie, unverzweigte und negativ geladene Glykosaminoglykan (GAG) setzt sich aus 2.000 - 25.000 repetitiven Disaccharid-Einheiten bestehend aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin, die glykosidisch β -1,3- und β -1,4- verbunden sind (siehe Abbildung 4). Im Gegensatz zu anderen unter 1.3.2 genannten GAG wird HA nicht im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat gebildet, sondern von drei membranständigen Hyaluronsäuresynthasen (HAS1-3). Diese HAS-Isoenzyme synthetisieren HA-Polymere unterschiedlicher Molekularmasse und geben diese in den extrazellulären Raum ab.^{36, 37} Die von HAS1 und 2 gebildete HA weist eine Masse von 2×10^5 bis 2×10^6 Dalton (Da) auf; die von der HAS3 synthetisierte HA wird hingegen mit einer geringeren molekularen Masse von 1×10^5 bis 1×10^6 Da abgegeben.³⁸ Die Synthasen können als Di- oder Multimere vorliegen.³⁹ Darüber hinaus wird eine Heterodimerisierung von HAS2 und HAS3 beschrieben.⁴⁰

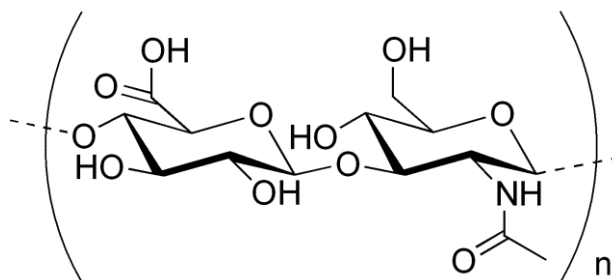


Abbildung 4: Strukturformel der Hyaluronsäure

Der enzymatische Abbau, der unter physiologischen Bedingungen der Homöostase des HA-Gehalts dient und bei dem ungefähr ein Drittel der vorliegenden Hyaluronsäure pro Tag degradiert und ersetzt wird, erfolgt durch Hyaluronidasen.⁴¹ Diese bauen native Hyaluronsäure (nHA, auch hochmolekulare HA oder *high molecular weight* HA (HMW-HA) genannt) zu kurzen Ketten (oHA, oligomere HA) ab. Sechs bekannte humane Hyaluronidasen (HYAL1-4, PH-20/SPAM1, PHYAL1) sind bisher beschrieben. Dabei scheinen die HYAL1 und -2 die wichtigsten Isoformen zu

sein. Das membrangebundene Enzym HYAL2 degradiert nHA zunächst auf eine Fragmentgröße von ungefähr 50 Disaccharid-Einheiten, entsprechend einer molekularen Masse von 2×10^4 Da. Diese HA-Fragmente werden anschließend über Endozytose aufgenommen, den Lysosomen zugeführt und dort durch die HYAL1 zu ihren Grundbausteinen abgebaut. Dies geschieht entweder in dem Gewebe, in dem sie degradiert werden, in umliegenden Lymphknoten oder aber über die Endothelzellen der Lebersinusoide.^{42, 43}

Die genaue Funktionalität der HYAL3 und -4 und PHYAL1 ist bisher nicht bekannt. Die humane PH-20/SPAM1 wird hingegen vor allem im Akrosom von Spermien nachgewiesen und dient dem Anheften und Eindringen des Spermiums in die Eizelle.^{44, 45}

1.3.2 Hyaluronsäure als Bestandteil der Extrazellulärmatrix

Die ECM stellt ein amorphes, makromolekulares Geflecht dar, das die Zellen eines jeden Gewebes umgibt. Bestandteile der ECM sind Faserproteine wie Kollagen und Elastin, nichtkollagene Glykoproteine wie Fibronectin, Laminin und Integrin sowie die Gruppe der Proteoglykane und GAG. Die verschiedenen GAG (Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat, Heparin, Keratansulfat) bilden unverzweigte Ketten aus repetitiven Disaccharideinheiten, die meist in sulfatierter Form vorliegen. Durch kovalente Bindung von GAG-Seitenketten an eine zentrale Proteinkette (Core-Protein), entstehen Proteoglykane. Eine Ausnahme bildet die Hyaluronsäure (HA). Sie bildet Makromoleküle aus sulfatfreien Disacchariden und kommt nicht in Proteoglykanen vor, kann jedoch Komplexe mit ihnen ausbilden. Aufgrund der strukturellen Eigenschaften weisen GAG eine hohe osmotische Wasserbindungskapazität auf, aus der eine gelartige Konsistenz resultiert. Die Zusammensetzung der ECM variiert je nach Eigenschaft eines Gewebes und unterliegt dabei ständigen Umbauvorgängen. Die einzelnen Komponenten stehen zumeist miteinander, aber auch mit den umgebenden Zellen in Verbindung. Die Zell-Matrix-Kontakte dienen, über die strukturellen Eigenschaften hinaus, der Signalübertragung zur Regulation diverser zellulärer Prozesse. Bei lokalen Umbauprozessen sind Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen und Plasminogenaktivator sowie Heparanasen und Hyaluronidasen beteiligt, die

Bestandteile der ECM durch proteolytische beziehungsweise hydrolytische Prozesse abzubauen.^{46, 47, 48}

1.3.3 Funktionen der Hyaluronsäurevarianten

Die Funktionen der HA sind abhängig von der molekularen Masse des Polymers, den Bindungspartnern sowie der vorliegenden Mikroumgebung.

HMW-HA dient in vielen Geweben vor allem als mechanisches Element. Beispielsweise verknüpft sie Proteoglykane untereinander und führt dadurch zu erhöhter Stabilität eines Gewebes. Durch ihre große Molekülmasse und ihre enorme Wasserbindungskapazität tritt sie in Form einer gelartigen Ummantelung von Zellen in Erscheinung. Diese Hüllfunktion unterstützt nicht nur die Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität durch Schutz vor physikalischer Krafteinwirkung, sondern kann die Zellen auch vor der Stimulation durch Effektorsubstanzen oder durch Zell-Zell-Kontakte abschirmen.^{49, 50} Am Beispiel der Ovulation konnten Tempel *et al.* darstellen, dass eine hochmolekulare HA-Schicht die Infiltration von Gefäßen hemmt.⁵¹ Zudem wird durch diese Barriere die Signaltransduktion für Vorgänge wie Zelldifferenzierung, Migration, Wachstum und Apoptose indirekt unterbunden und die Produktion pro-inflammatorischer Moleküle verhindert.⁵² Die daraus resultierende anti-inflammatorische Wirkung der HMW-HA wird zudem durch direkte Einwirkung auf die Genexpression bestimmter Zellen beschrieben und zeigt sich beispielsweise in der Inhibition der T-Zellproliferation.⁵³ Die eingeleiteten Signalwege werden durch die Bindung von HA an entsprechende Rezeptoren induziert beziehungsweise inhibiert.⁵⁴

LMW-HA und oHA spielen vor allem bei pro-inflammatorischen und pro-angiogenen Prozessen eine wesentliche Rolle. So resultiert aus einer Verletzung der Gewebeintegrität zunächst lokal eine vermehrte Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch die betroffenen Zellen sowie Thrombozyten und einwandernden Leukozyten. Dies wirkt sich unter anderem auf die Expression der HA-Synthasen und -Rezeptoren aus.^{55, 56} Die dadurch gesteigerte HA-Synthese korreliert in dieser Situation mit dem Vorliegen von LMW-HA und oHA.⁵⁷ Die Entstehung dieser bioaktiven, kurzkettigen HA-Fragmente ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Diskutiert werden neben der katabolen Degradation über die bekannten Hyaluronidasen und gegebenenfalls deren vermehrter Expression, die

Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies oder eine veränderte HA-Synthese.^{58, 59, 60} Oligomere HA stimuliert durch Bindung an Makrophagen (über den HA-Rezeptor CD44) deren Expression pro-inflammatorischer Gene.^{61, 62} Dementsprechend kommt es zu einer gesteigerten Einwanderung ins Gewebe, was wiederum die vermehrte Expression des intrazellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) in EC bedingt.⁶³ Über die Bindung von oHA an den entsprechenden Rezeptoren können in Endothelzellen auch direkt Signaltransduktionen für Proliferation und Migration eingeleitet werden, die zur (Re-)Vaskularisierung führen.⁶⁴

Der Einfluss der von HAS1 synthetisierten HA wird vor allem bei inflammatorischen Prozessen, aber auch in tumorösen Geweben diskutiert.⁶⁵ Die HAS2 extrudiert HA, die die Matrix von vaskulären glatten Muskelzellen maßgeblich beeinflusst und ebenfalls mit Tumorwachstum assoziiert ist.^{66, 67} Darüber hinaus nimmt sie während der Embryonalentwicklung eine besondere Rolle bezüglich der Entstehung der kardialen und vaskulären Strukturen ein.⁶⁸ Im adulten Organismus werden der von HAS2 synthetisierten HA keine relevanten angiogenen Funktionen beigemessen. Die Funktionen der von der HAS3 gebildeten HA findet insbesondere bei der Angiogenese und in inflammatorischen Prozessen Bedeutung und wird deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

1.3.4 Bindungspartner der Hyaluronsäure

1.3.4.1 *Cluster of Differentiation 44 (CD44)*

Einer der bedeutendsten Bindungspartner für HA ist *Cluster of Differentiation* (CD) 44.⁶⁹ Die Standardvariante des Transmembranglykoproteins CD44 wird in zahlreichen Geweben exprimiert und ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt.⁷⁰ Veränderungen in der Expression oder Dysfunktionen werden mit diversen pathologischen Vorgängen in Verbindung gebracht.

CD44 setzt sich aus drei Anteilen zusammen, die sich in eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembranregion und einen intrazellulären Abschnitt unterteilen lassen. Die extrazelluläre Domäne dient als Binderegion für HA und andere GAG.⁷¹ Die HA-Molekülmasse muss dazu mehr als 20 Disaccharid-Einheiten betragen. Zudem werden variable Bindungsaffinitäten für unterschiedlich große HA-Moleküle beschrieben. Nicht abschließend geklärt ist, ob dies auf unterschiedliche

Spleißvarianten oder auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen ist.⁶⁹ Auch die Transmembranregion unterliegt Modifikationen während der Transkription und nach der Translation, die beispielsweise durch auffallend große Varianten in Tumorzellen in Erscheinung treten. Der intrazellulär liegende Abschnitt interagiert zum einen mit dem Zytoskelett, zum anderen werden über ihn die in Tabelle 1 aufgeführte Signalwege induziert.^{70, 72, 73, 74}

Tabelle 1: Induzierte Signalwege durch Bindung von Hyaluronsäure an CD44

Signalweg	Effekte
unbekannt ⁷⁴	HA-Internalisierung, HA-Überführung zum Lysosom, Induktion der Hyaluronidasen
RhoA/Rac1 ^{75, 76, 77, 78, 79} ERM ⁸⁰ (Ezrin-Radixin-Morsin-Proteine)	Beeinflussung der Endothelzellintegrität Zytoskelettales Rearrangement, Migration, Adhäsion, Differenzierung; (Tumor-)Wachstum, (Tumor-)Zellüberleben
PI3K/AKT ^{81, 82}	Proliferation, (Tumor-)Zellüberleben, Apoptose, Migration Vermehrte VEGF-Ausschüttung, Angiogenese
Matrix-Metalloproteasen ⁸³	Gesteigerte Matrixmodulation/-Degradation Aktivierung von TGF- β , Tumorerinvasion, Angiogenese
TLR-2+Zymosan ⁵⁰ TLR-4 ⁸⁴	Inhibition der NF- κ B-Expression Stimulation der NF- κ B-Expression à Inflammation, Angiogenese, Migration
PDGF β -Rezeptor ⁸⁵	(Fibroblasten-)Migration

1.3.4.2 *Receptor for Hyaluronan Mediated Motility (RHAMM)*

Neben dem o.g. CD44 wird dem *Receptor for Hyaluronan Mediated Motility* (RHAMM; alias *Hyaluronan Mediated Motility Receptor* (HMMR oder CD168) in der gegenwärtigen Literatur eine entscheidende Rolle durch die Bindung an HA beigemessen.⁸⁶ Er liegt aufgrund alternativen Spleißens in verschiedenen Isoformen vor und wird bei Gewebsverletzungen und in Tumoren vermehrt exprimiert. Der HA-Rezeptor befindet sich an der Zelloberfläche, aber auch im Zytoskelett, in Mitochondrien und dem Zellkern. Die Bindung zur RHAMM-Variante, die sich an der Zelloberfläche befindet, ist bei der Induktion von Signalwegen von größter Bedeutung. Sie leitet Prozesse ein, die unter anderem die Zelladhäsion und -migration betreffen.⁸⁷ Die genauen Funktionen der intrazellulären Isoformen sind noch nicht abschließend erforscht. Es wird jedoch angenommen, dass sie zur

Signalübertragung vom Zellkern zur extrazellulären Umgebung beitragen (*inside-out-signaling*).^{88, 89} In folgender Übersicht (Tabelle 2) sind Signalwege und die Auswirkungen der Induktion infolge der Bindung von HA an RHAMM aufgeführt.

Tabelle 2: Induzierte Signalwege durch Bindung von Hyaluronsäure an RHAMM

Signalweg	Effekte
c-Src ⁹⁰ (Tyrosinkinase pp60)	Migration
ERK1/2 ⁹¹	Migration, Adhäsion, Proliferation, Zellüberleben
Ras; PKC (Protein Kinase C); FAK (<i>Focal Adhesion Kinase</i>); PI3K (Phosphatidylinositol Kinase) ⁹²	Migration, Adhäsion, Proliferation
bFGF (<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>) ⁹³	Angiogenese

1.3.4.3 Angiogene Effekte der Bindung von Hyaluronsäure an CD44 und/oder RHAMM

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Bindung von HA an CD44 und RHAMM auf die Endothelzellfunktion und somit auf die Angiogenese auswirkt.

Savani *et al.* stellen mittels blockierender Antikörper gegen CD44 und RHAMM Auswirkungen auf die Bindung von EC an HA, sowie die Proliferation, Migration und Bildung tubulärer Strukturen von EC dar.⁹⁴ Es wird beschrieben, dass CD44 sowohl auf die Adhäsionseigenschaften von EC an HA-Einfluss nimmt als auch die Proliferation von EC maßgeblich induziert. Darüber hinaus stellt sich insbesondere die Bindung von HA an endothelial vorliegendem RHAMM als auslösender Faktor für die EC-Migration und Angiogenese dar. Bei der Untersuchung des Einflusses auf die EC-Eigenschaften bezüglich der Ausbildung tubulärer Strukturen scheinen CD44 und RHAMM synergistisch zu wirken.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass neben der Molekülmasse der HA auch andere Bindungspartner (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2) mitwirken.⁹⁵

1.3.5 Stimulation und Inhibition der Hyaluronsäuresynthese

Die Hyaluronsäuresynthese wird bedarfsadaptiert herauf- beziehungsweise herab-reguliert. Bei Inflammation und Gewebeveränderungen, wie Verletzungen oder

Tumoren, wird die Syntheserate vor allem über die erhöhte Expression der HA-Synthasen reguliert. Darüber hinaus ist das ausreichende Vorliegen der Substrate Uridindiphosphat (UDP)-N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) und UDP-Glucuronsäure (GlcA) von entscheidender Bedeutung und stellt den limitierenden Faktor bei der HA-Synthese dar.

Eine Stimulation erfolgt insbesondere über die vermehrte Ausschüttung von *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β) und den Tumor-Nekrose Faktor-alpha (TNF- α).^{96,36} Die zudem daraus resultierende Induktion der Angiogenese kann wiederum der Aufrechterhaltung der gesteigerten HA-Synthese dienen, indem über neue Gefäße weitere Entzündungszellen, Nährstoffe und Sauerstoff ins inflammatorische Areal gelangen können. Zudem bildet die größere Endothelzelloberfläche eine erhöhte Kapazität für die Produktion von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und anderen inflammatorischen Stimuli.

Eine gezielte Inhibition der HA-Synthese wird im Rahmen eines induzierten Substratmangels beschrieben.^{97, 98}

1.4 Induzierte Hyaluronsäure-Defizienz

Das Ausschalten eines Gens (*knockout*) hat sich in den letzten Jahren zu einem probaten Mittel für den Erkenntnisgewinn seiner biologischen Rolle entwickelt. Es hat einen besonderen Stellenwert bei der Nachvollziehbarkeit physiologischer und pathologischer Prozesse, in die das Gen involviert ist. Darüber hinaus stellt es eine Grundlage in der Erforschung pharmakologischer Therapiemöglichkeiten dar.

Voraussetzung für die Beeinflussung der genetischen Informationen ist die homologe Rekombination, die Eigenschaft, dass DNA-Abschnitte zwischen homologen Chromosomen gegenseitig ausgetauscht werden. Dieser Vorgang findet bei Säugern unter physiologischen Bedingungen während der Meiose statt. Um ein künstlich verändertes DNA-Molekül in eine Zelle einzufügen, müssen die benachbarten Bereiche in ausreichender Länge mit der DNA der Zielzelle übereinstimmen. Zur Inaktivierung wird ein sogenannter Inaktivierungsvektor mit einer Selektionseigenschaft kreiert, der an das Zielgen angrenzende Abschnitte enthält, die modifizierbar sind. Üblicherweise ist darin eine genetische Information

enthalten, die zu einer Antibiotikaresistenz führt. Nachdem der Inaktivierungsvektor mit dem künstlich veränderten DNA-Molekül den Zellen zugefügt wurde, werden diese mit Antibiotika versehen. Daraus resultiert, dass sich nur die Zellen vermehren, bei denen sich nach homologer Rekombination eine Antibiotikaresistenz im Zielgen entwickelt hat und es folglich ausgeschaltet wurde. Der Gendefekt liegt zumeist nur auf einem Allel vor und ist demnach zunächst heterozygot. Nach Transfektion der veränderten Zellen in Empfängermausembryonen können heterozygote Tiere miteinander gekreuzt werden, um homozygote Tiere hervorzubringen, die die vollständige Defizienz, den *knockout*, des betroffenen Gens in sich tragen.⁹⁹

Das Ausschalten des für die *Has1* kodierenden Gens findet in der gegenwärtigen Forschung vor allem Anwendung bei der Untersuchung der Auswirkungen glykämischen Stresses, entzündlichen Vorgängen und Tumoren. Unter physiologischen Bedingungen ist die Expression und die enzymatische Aktivität der HAS1 im Vergleich zu den Hyaluronsäuresynthasen 2 und 3 vernachlässigbar gering.¹⁰⁰

Der kongenitale *knockout* des *Has2*-kodierenden Gens geht mit schweren vaskulären und kardialen Schäden einher und führt bereits pränatal zum Versterben der Versuchstiere.⁶⁸ Dieses macht die große physiologische Bedeutung der von HAS2 extrudierten HA bereits unter basalen Bedingungen deutlich. Zur Untersuchung der Rolle der HAS2 bei pathologischen Veränderungen werden Mäuse generiert, bei denen das kodierende Gen erst postnatal inaktiviert werden kann (konditionaler *knockout*).¹⁰¹

Der *knockout* des *Has3*-kodierenden Gens lässt sich, wie bei der *Has1*, bereits kongenital induzieren.

1.5 Ziel der Arbeit

Präliminäre Daten ergaben, dass *Has3*-defiziente Mäuse nach unilateraler Hinterlauf-Ischämie eine reduzierte Rekonstituierung des Blutflusses und eine damit einhergehende verminderte Kapillarisation im betroffenen Hinterlauf aufweisen (Arbeitsgruppeninterne Daten, Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Mit dieser Arbeit soll evaluiert werden, ob dieser Effekt durch die operativ induzierte Ischämie zu begründen ist oder sich, unabhängig von pathophysiologischen Vorgängen, bereits durch den kongenitalen *knockout* des *Has3*-kodierenden Gens basale Veränderungen in der Gefäßdichte ergeben.

Hierfür werden Hinterläufe von Wildtyp- und *Has3*-defizienten Mäusen unter basalen Bedingungen untersucht. Es sollen die Kapillardichte, die Muskelfibrillenanzahl, der Hyaluronsäuregehalt und die Protein-Expression der Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM quantifiziert und im Verteilungsverhalten verglichen werden. Überdies erfolgt eine Analyse der Gen-Expression von *Has1*, 2 und 3, *Cd44*, *Rhamm* und der Hyaluronidasen 1 und 2 auf RNA-Ebene in Hinterlaufmuskelgewebe von *Has3-knockout* Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Arbeitsmittel

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller ¹
cDNA-Cycler	Mastercycler EP	Eppendorf
<i>Dissociator</i>	<i>gentleMACS Dissociator</i>	Miltenyi Biotec
Echtzeit-PCR System	7300	Applied Biosystems
Kryostat	CM 1850	Leica
Mikroskop	Axio Imager.M2	Zeiss
RNA-Spektrometer	Nanodrop-1000	PEQLAB Biotechnologie
Vortex Mixer	7-2020	neoLab
Zentrifuge	5418 R	Eppendorf

Tabelle 4: Materialien

Materialien	Hersteller*
Deckgläser	Engelbrecht
Einbettungszyllinders	Oehmen
Eppendorf-Tubes	Eppendorf
Kieselgel (Silica Gel Orange)	Carl Roth
KP-CryoCompound	Klinipath
Kryo-Aufbewahrungsboxen	VWR
Mikrotom-Klingen	Leica
M-Tubes	Miltenyi Biotec GmbH
Objekträger (SuperFrost plus)	R. Langenbrinck

Tabelle 5: Substanzen

Substanzen	Hersteller*
Aceton	Carl Roth
Adenosin	Sanofi
<i>Avidin-Biotin-Blocking System</i> [®]	Thermo Fisher Scientific
<i>bovine serum albumin</i> (BSA)	Sigma-Aldrich
Chloroform	Merck KGaA
Diaminobenzol (DAB)	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA
Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich
Ethanol	VWR Chemicals
<i>fetal calf serum</i> (FCS)	Sigma-Aldrich
Flüssigstickstoff	Linde
Formaldehyd	Carl Roth
Hämalaun-Lösung	Merck KGaA

¹ Herstellerverzeichnis im Appendix

Heparin	Rotexmedica
Hoechst® 33342 (H3570)	Thermo Fisher Scientific
Hyaluronsäure-Bindeprotein (HABP), biotinyliert	Merck KGaA
Isopentan (2-Methylbutane)	Carl Roth
Isopropanol	Merck KGaA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA
pegGOLD TriFAST™	PEQLAB Biotechnologie
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	Thermo Fisher Scientific
<i>QuantiTect Reverse Transcription Kits</i>	Qiagen
Reinstwasser Milli-Q®	Merck Millipore
Roti®-Mount	Carl Roth
Roti®-Mount FluorCare DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol)	Carl Roth
Saccharose	Merck KGaA
Salzsäure (HCl)	Carl Roth
Streptavidin Peroxidase	Sigma-Aldrich
<i>Tris-buffered-saline</i> (TBS)	Merck KGaA
Tween®20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Carl Roth
Vectashield® <i>Mounting Medium for fluorescence</i>	Vector Laboratories
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck KGaA
Xylol/Roticlear	Carl Roth

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,3 mM Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O (pH 7,4)
10x TBS	24,2 g Tris 80,0 g NaCl ad 1l <i>Aqua dest.</i> (pH 7,6)
10x TB	60,57 g Tris (MW 121,14 g/mol) ad 1l <i>Aqua dest.</i> (pH 7,6)
Blockierlösung	20 mM Tris 137 mM NaCl 10 % FCS 1 % BSA
H ₂ O ₂ -Lösung	30 % H ₂ O ₂ auf 3 % mit 1x PBS verdünnt
0,05 % Tween®20	Tween®20 auf 0,05 % mit 1x PBS verdünnt

Tabelle 7: Primär-Antikörper und Bindeproteine

Primär-Antikörper	Katalognummer	Hersteller
Anti-CD31 (<i>rat</i>)	ab7388	Abcam
Anti- α -smooth-muscle-actin (<i>rabbit</i>)	ab5694	Abcam
Anti-CD44 (<i>rat</i>)	5505308	BD Pharmingen
Anti-CD44 (<i>rabbit</i>)	HPA005785	Simga-Aldrich
Anti-RHAMM (<i>rabbit</i>)	E16820	Spring Bioscience
Anti-mouse CD45 (<i>rabbit</i>)	ab10558	Abcam
Isolectin GS-IB4, Alexa Fluor® 488 Conjugate	I21411	ThermoFisher
Mac-2 (<i>rat</i>)	CL8942AP	Cedarlane

Tabelle 8: Sekundär-Antikörper

Sekundär-Antikörper	Katalognummer	Hersteller
Rhodamin Red X (<i>goat anti-rat</i>)	112-295-167	Jackson ImmunoResearch Labs
Alexa Fluor 488® (<i>goat anti-rabbit</i>)	ab150077	Abcam
Alexa Fluor 647® (<i>goat anti-mouse</i>)	ab150115	Abcam
redTMX-conjugated (<i>goat anti-rat</i>)	2338128	Jackson ImmunoResearch Labs

2.2 Allgemeines zum histologischen Arbeitsteil

2.2.1 Rahmenbedingungen

Die Tierhaltung wurde nach den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes und die Materialentnahme (Organentnahme) von Dr. rer. nat. Till Freudenberger und Dr. rer. nat. Rebekka Schneckmann (Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt.

Die Materialbereitstellung erfolgte ausschließlich auf Basis der Organentnahme, ohne dass etwaige Eingriffe zuvor durchgeführt wurden (O-Nummer des ZETT: O4/02).

Die verwendete Hinterlaufmuskulatur entstammte männlichen C57BL/6J Mäusen (Janvier Labs, Le Genest Saint-Isle, Frankreich und hauseigene Zucht in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT)) im adulten Alter zwischen 16-20 Wochen. Die Tiere wurden bis zur Organentnahme in einem Zwölf-Stunden-Tag-/Nachtrhythmus mit Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum* gehalten.

Insgesamt wurde die Hinterlaufmuskulatur von jeweils sechs Wildtyp- und *knockout*-Mäusen für immunhistochemische Färbungen und zusätzlich von weiteren drei Wildtyp- und *knockout*-Mäusen für die Bestimmung der qPCR verwendet.

2.2.2 Entnahme und Aufbereitung des murinen Hinterlaufmuskels

Bei den untersuchten Materialien handelte es sich um den *Musculus gastrocnemius* des Hinterlaufs, der nach dem Protokoll von Driesen *et al.* von den unter 2.2.1 genannten Personen entnommen wurde.¹⁰³ Dazu wurden die Mäuse drei bis fünf Minuten vor der Perfusionsfixierung mit einer intraperitonealen Gabe von 500 internationalen Einheiten (I.E.) Heparin antikoaguliert. Bei geclippter *Vena cava* wurde die Perfusionsfixierung mit einer Laufrate von 14 ml/min durchgeführt. Die Perfusionslösung setzte sich aus Heparin 1 I.E./ml, Adenosin 3 µg/ml und 4 % Formalin mit einem jeweiligen Volumen von 15 ml zusammen. Für die Entnahme der Unterschenkelmuskulatur musste diese zunächst proximal von der überlappenden Oberschenkelmuskulatur freigelegt werden. Der entnommene *Musculus gastrocnemius* wurde für jeweils eine Nacht bei 4 °C in 15 % Saccharose und anschließend in 30 % Saccharose gelagert. Zur Einbettung wurden die Muskelpräparate in dem Gefriermedium „KP-CryoCompound“, angelehnt an die Empfehlungen von Limbourg *et al.*, mit der Achillessehne in Richtung der Öffnung des Einbettungszyinders positioniert.¹⁰² Nach Überprüfung der korrekten Lage des Muskelpräparats wurde der Einbettungszyinder in, mittels Flüssigstickstoff gekühltem, Isopentan (2-Methylbutane) bei -40 °C eingefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

Die Entnahme der Hinterlaufmuskulatur für die Analyse der Genexpression erfolgte unmittelbar nach induziertem *Exitus letalis* der Tiere ohne vorherige

Perfusionsfixierung. Die Muskelpräparate wurden direkt nach der Entnahme tiefgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei 80 °C verwahrt.

2.2.3 Gefrierschnitte

Zur weiteren Verarbeitung der bei -80 °C tiefgefrorenen, konservierten Muskelpräparate wurden diese zunächst für zwei Stunden bei -20 °C aufbewahrt. Anschließend wurden mit dem Kryostaten 10 µm dicke Gefrierschnitte des Präparats, beginnend mit dem proximalen Anteil des *Musculus gastrocnemius* in Richtung der Achillessehne, angefertigt.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden fünf Ebenen nach dem Protokoll von Driesen *et al.* aufgesucht.¹⁰³ Die Ebene 1 definierte sich durch das Auftreten einer Bindegewebssepte, durch die arterielle Gefäße und Nerven in die Muskelbäuche hindurch ziehen. Von diesen Referenzpunkten (siehe Abbildung 5) ausgehend wird jeder folgende Schnitt, der 10 µm entspricht, gezählt und die Ebenen 2–5 dementsprechend nach jeweils 200 µm festgelegt, sodass die fünf Ebenen gleichmäßig über 1000 µm verteilt begutachtet werden konnten. Für die folgende Verarbeitung wurden die konsekutiven Schnitte der einzelnen Ebenen in die jeweiligen Färbegruppen unterteilt.

Es wurden zwei Schnitte pro Objektträger aufgebracht. Nach Lufttrocknung der Gefrierschnitte wurden diese in Kryo-Aufbewahrungsboxen einsortiert, die mit einem Säckchen Kieselgel versehen und mit Klebeband verschlossen bei -20 °C aufbewahrt wurden. Die langfristige Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

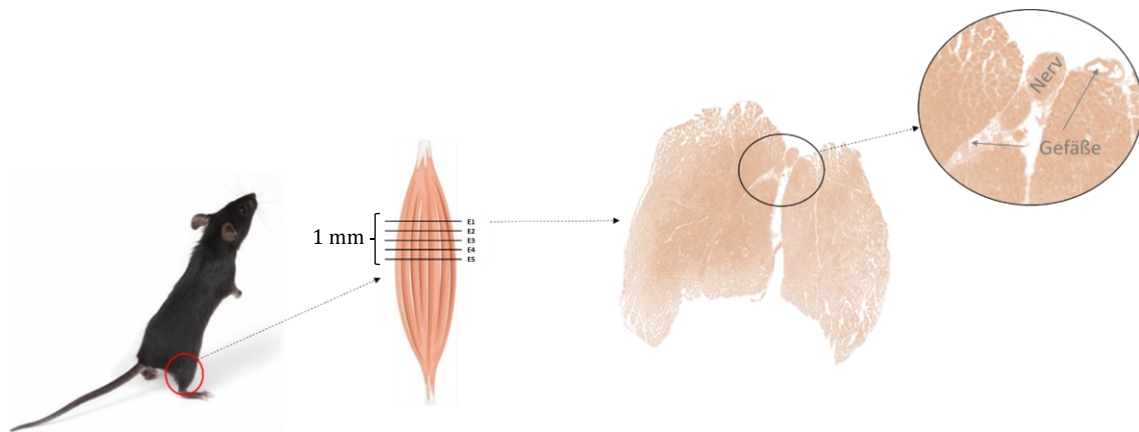


Abbildung 5: Referenzstrukturen vordefinierter Ebenen

Das entnommene Muskelpräparat entstammt dem murinen Hinterlauf und wird von proximal nach distal in 10 μm Schnitte beginnend bei den vordefinierten, markierten Referenzstrukturen geschnitten mit einem Abstand von 200 μm zwischen den einzelnen Ebenen (E1-E5).

2.3 Färbungen

2.3.1 Allgemeines

Die in den verschlossenen Kryo-Aufbewahrungsboxen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Schnitte wurden zunächst für mindestens 60 Minuten bei Raumtemperatur äquilibriert.

Aus jeder der beschriebenen fünf Ebenen, mit einem Abstand von je 200 μm zueinander, wurde ein Objektträger mit je zwei konsekutiven Gefrierschnitten für die jeweilige Färbung ausgewählt.

Die im Folgenden genannte „Blockierlösung“ bzw. „Blockierung“ (Zusammensetzung siehe Tabelle 6) diente der Blockade unspezifischer Bindungsstellen vor der immunhistochemischen Antikörperapplikation und wurde den Schnitten für mindestens eine Stunde zugeführt.

Anschließend wurden die histologischen Schnitte dreimalig für jeweils fünf Minuten mit 1x PBS (Zusammensetzung siehe Tabelle 6) gewaschen.

Vor der ersten Antikörperpipettierung wurden die Schnitte mit einem Fettstift umkreist, um das Verlaufen der Antikörperlösungen zu verhindern.

Während des Färbevorganges wurden die Schnitte stets in einer feuchten Kammer inkubiert, um diese vor Austrocknung zu schützen. Dazu wurde ein ausreichend

großes Gefäß mit feuchten Tüchern ausgelegt und passendem Deckel versehen, um ein Verdunsten von Flüssigkeiten zu verhindern. Bei Fluoreszenzfärbungen war darüber hinaus ab dem Auftragen des Zweitantikörpers, der mit einem bestimmten Chromophor gekoppelt war, lichtgeschützt zu arbeiten.

Eine Positivkontrolle war Bestandteil jeder Färbung. Als Negativkontrollen diente einer der zwei Schnitte pro Objektträger. Dieser wurde anstelle des Erstantikörpers nur mit 1% BSA/1x PBS versehen.

Die Färbungen wurden nach entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt und die Färbereste in den dafür vorgesehenen Abfallbehältnissen entsorgt.

2.3.2 Hämalaun-Eosin-Färbung

Die Hämalaun-Eosin-Färbung, wie in Abbildung 6 gezeigt, diente der Übersichtsdarstellung der Kryoschnitte.

Die Fixierung erfolgte für 10 Minuten in 10 % Formalin bei 4 °C, gefolgt von Waschen mit 1x PBS. Für die Kernfärbung wurden die Objektträger zunächst für eine Minute in *Aqua destillata* und dann für eine weitere Minute in die Hämalaunlösung gegeben, da dieser basische Farbstoff saure Strukturen, wie DNA, blau färbt. Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser abgespült und daraufhin kurz in 1 % Salzsäure (HCl) eingetaucht. Zum Bläuen der Kerne wurden die Objektträger für fünf bis zehn Minuten (Färbestatus kann direkt unter dem Mikroskop evaluiert werden) unter fließendes kaltes Leitungswasser gestellt. Alle basischen Strukturen (z.B. Zytoplasma) wurden darauffolgend rot gefärbt, indem sie für eine Minute in 1 % Eosin gegeben und danach mit *Aqua destillata* abgespült wurden. Um die Schnitte ausreichend lang aufbewahren zu können, mussten diese entwässert und mit einem Einschlussmittel haltbar gemacht werden. Dazu versah man die Objektträger mit der sogenannten aufsteigenden Ethanolreihe. Dabei wurden die Schnitte für jeweils zwei Minuten zuerst in 70 % Ethanol, dann in 96 % Ethanol, gefolgt von 100 % Ethanol und zuletzt für fünf Minuten in Xylol/Roticlear gegeben.

Abschließend wurden die Schnitte mit dem Einschlussmittel RotiMount® und einem Deckgläschen versehen. Die Objektträger mussten für mindestens 24 Stunden unter dem Abzug ausdünsten, bis das Einschlussmittel komplett ausgehärtet war.

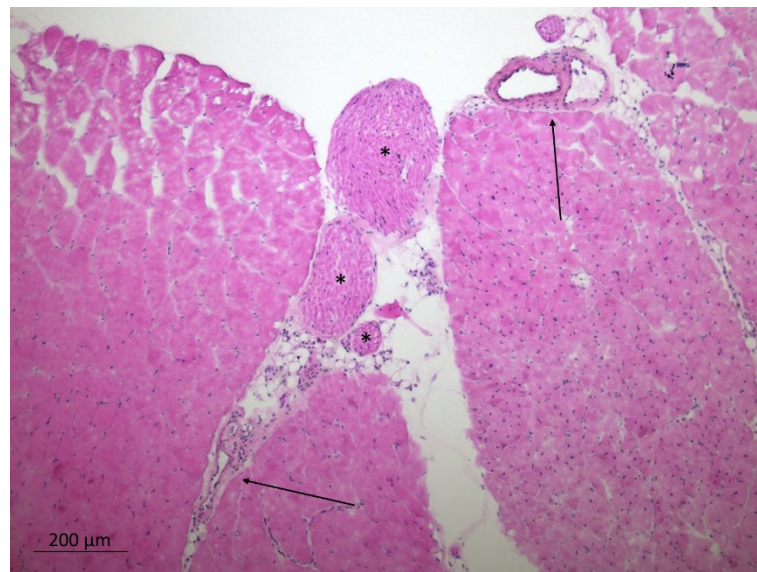


Abbildung 6: Repräsentatives Bild einer Hämalaun-Eosin-Färbung

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus murinem Hinterlaufmuskelgewebe, das mittels Hämalaun-Eosin-Färbung zu Übersichtszwecken angefärbt wurde. Die Abbildung zeigt eine zwischen zwei Muskelbauchanschnitten zentral gelegene Bindegewebssepte, durch die Blutgefäße (Pfeile) und Nerven (*) in das Muskelgewebe nach distal hineinziehen.

2.3.3 CD31/ α -smooth-muscle-actin-Doppelfärbung

Zur Darstellung der Gefäße wurde das Endothel mit einem Antikörper gegen CD31 und die glatte Gefäßmuskelschicht mit einem Antikörper gegen α -smooth-muscle-actin (α -SMA) detektiert, wie in Abbildung 7 dargestellt.

Im ersten Schritt des Färbeprozesses wurden die Gefrierschnitte für 20 Minuten bei 4 °C in Aceton fixiert und anschließend mit 1x PBS gewaschen und für eine Stunde blockiert.

Circa 30 μ l des Primärantikörpers gegen CD31 (1:100) wurden aufgetragen und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde nach erneutem Waschen der Sekundärantikörper Rhodamin Red X *anti-rat* (1:100) für die durch den Primärantikörper detektierten CD31-positiven Strukturen aufgetragen, für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abgewaschen. Dem zweiten Färbeteil wurden die Schnitte zur Darstellung der glatten Muskelzellen unterzogen. Hierzu wurde ein Primärantikörper gegen α -SMA (1:100) auf die Schnitte pipettiert und nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur abgewaschen. Als Sekundärantikörper diente Alexa Fluor 488® *goat anti-rabbit*

(1:100). Auch dieser wurde für 60 Minuten inkubiert und die Schnitte ein letztes Mal gewaschen. Abschließend wurden die Präparate zur Kernfärbung mit Roti®-Mount FluorCare DAPI und einem Deckgläschen versehen und zum Trocknen unter Lichtabschluss bei 4 °C verwahrt.

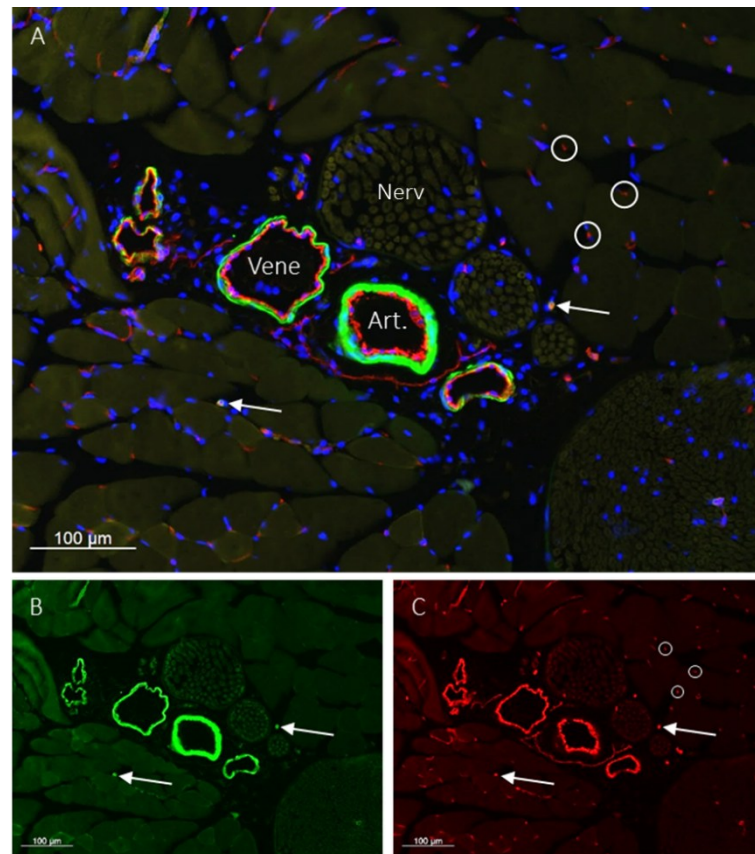


Abbildung 7: Repräsentatives Bild der CD31/ α -smooth-muscle-actin-Doppelfärbung

Immunhistochemische Färbung der Blutgefäße von murinem Hinterlaufmuskelgewebe mittels eines anti-CD31- (rot) und α -smooth muscle actin-Antikörpers (grün), Kernfärbung mit DAPI (blau). **A** Darstellung in 3-Kanal-Aufnahme (Rhodamin+eGFP+DAPI). Zentral im Bildausschnitt liegen Blutgefäße und Nerven (Nerv), die von Skelettmuskelgewebe umgeben sind. Die Arterie (Art.) stellt sich durch eine starke glattmuskuläre Wandschicht (grün) dar. Benachbart findet sich eine Vene (Vene) mit schlankerer glattmuskulärer Wandschicht (grün). Das Endothel ist in Rot dargestellt. Mit Pfeil gekennzeichnet finden sich Kapillaren (Gefäßdurchmesser kleiner als 10 µm; einschichtiges Endothel (rot)) mit angelagerten CD31-positiv markierten Perizyten (grün). Beispielhaft umkreist zeigen sich Kapillaren, die nur ein positives CD31-Signal (rot) für Endothel aufweisen.

B Darstellung der glatten Muskelzellen mittels α -smooth muscle actin-Antikörpers (grün) im Grün-Kanal (eGFP) **C** Darstellung des Endothels mittels anti-CD31 im Rot-Kanal (Rhodamin).

2.3.4 Hyaluronsäure-Färbung

Zur Darstellung des Hyaluronsäuregehalts wurde der extrazelluläre Hyaluronsäureanteil nach Affinitätsbindung am Hyaluronsäure-Bindeprotein (HABP) durch Diaminobenzol (DAB) detektiert, siehe Abbildung 8.

Für die Fixierung wurden die Objektträger für 20 Minuten bei 4 °C mit Aceton versehen. Nach dem Waschen wurden die Gefrierschnitte mit einem Avidin-Biotin-Block auf die weiteren Färbeschritte vorbereitet, um endogenes Biotin zu blockieren, bevor das biotinierte Bindeprotein appliziert wurde. Die Avidinlösung wurde für zehn Minuten auf die Schnitte gegeben. Vor dem Auftragen der Biotinlösung wurden die Objektträger mit 1x PBS für fünf Minuten gewaschen. Die Einwirkzeit der Biotinlösung lag bei zehn Minuten, gefolgt von erneutem Waschen. Anschließend erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen für mindestens 60 Minuten bei Raumtemperatur.

Im ersten Schritt wurde HABP in 1 % BSA/1x PBS mit einer Verdünnung von 1:100 verwendet und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst gewaschen und für weitere fünf Minuten anschließend einem Wasserstoffperoxid-Block (H_2O_2) zur Inaktivierung der Peroxidasen bei Raumtemperatur unterzogen. Die H_2O_2 -Lösung (siehe Tabelle 6) war immer frisch herzustellen und lichtgeschützt zu verwahren, so auch die Objektträger während der Einwirkzeit. Nach erneutem Waschen wurde Streptavidin-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:200 in 1x PBS aufgetragen, für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abgewaschen. Zur Detektion der Hyaluronsäure wurden die Objektträger zunächst für zehn Minuten in 1x TB gegeben. Daraufhin wurden diese für maximal zehn Minuten (je nach Bräunung) mit einer frisch hergestellten DAB-Lösung versehen. Die DAB-Lösung setzte sich aus 80 ml DAB-Substrat auf 4 ml DAB-Chromogen zusammen. Zum Beenden des Bräunungsvorgangs wurden die Objektträger erneut in 1x TB (fünf Minuten) und zuletzt für eine Minute in *Aqua destillata* gegeben.

Für die Kernfärbung wurden die Objektträger für eine Minute in Hämalaun gegeben und anschließend mit Leitungswasser abgespült, um daraufhin kurz in 1 % HCl eingetaucht zu werden. Zum Bläuen der Kerne wurden die Objektträger für fünf bis zehn Minuten (Färbestatus konnte direkt unter dem Mikroskop evaluiert werden) unter fließendes, kaltes Leitungswasser gestellt. Zum Beenden des Bläuens wurden die Objektträger für eine Minute in *Aqua destillata* getaucht.

Um die Schnitte ausreichend lang aufbewahren zu können, mussten diese mit der aufsteigenden Ethanolreihe entwässert werden und mit einem Einschlussmittel (RotiMount®) haltbar gemacht werden, wie bereits unter 2.3.2 im Detail beschrieben. Bei dieser Färbung war besonders die Spezialentsorgung des DAB und das Arbeiten unter dem Abzug zu beachten.

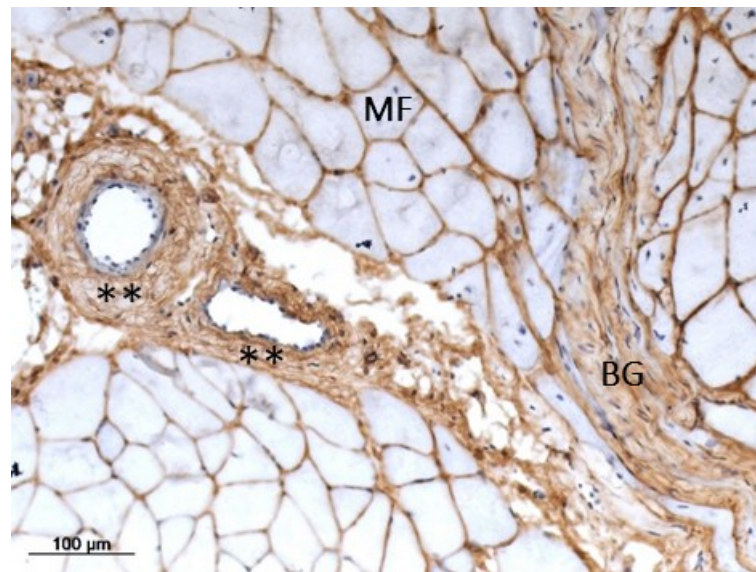


Abbildung 8: Repräsentatives Bild der Hyaluronsäure-Färbung

Immunhistochemische Färbung von murinem Hinterlaufmuskelgewebe mittels Hyaluronsäure-Bindeprotein (HABP) und Diaminobenzol (DAB). Der Bildausschnitt zeigt angefärbte Hyaluronsäure (braun), die die Muskelfibrillen (MF) als schmalen Saum umgibt, die Blutgefäße umhüllt (**) und eine Bindegewebssepte (BG) füllt.

2.3.5 CD44-Färbung

Für die Färbung des HA-Rezeptors CD44 wurden zunächst verschiedene Antikörper miteinander verglichen, die auf Kryoschnitten Anwendung finden konnten.

Es wurden zwei Gruppen (1 und 2) mit jeweils zwei Untergruppen (a und b) gebildet. In der Gruppe 1 wurde ein CD44-Erstantikörper aus dem Kaninchen (1:50; Sigma Prestige *antibodies* anti-CD44) mit einem Zweitantikörper aus der Ziege (1:200; Alexa Fluor 488 *anti-rabbit*) verwendet. In der Gruppe 2 wurde ein Erstantikörper aus der Ratte (1:50; BD Pharmingen™) mit einem Zweitantikörper aus der Ziege (1:200; Rhodamin Red X *anti rat*) versehen. Die einzelnen Gruppen bestanden aus einem doppelten Satz (a und b) an Kryoschnitten aus den gleichen Muskelpräparaten von Wildtyp- und *knockout*-Mäusen. Die Untergruppe b aus Gruppe 1 und 2 wurde vor

der Applikation der Antikörper einer Permeabilisierung mit Tween®20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate) unterzogen.

Die Fixierung erfolgte für beide Gruppen in Aceton für 20 Minuten bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für jeweils fünf Minuten, wurden die Gruppen 1b und 2b dem 20-minütigen Permeabilisierungsschritt mit 0,05 % Tween®20 unterzogen und darüber hinaus jedes Waschen folgend mit 0,05 % Tween®20 in 1x PBS durchgeführt. Die Schnitte der Gruppen 1a und 2a wurden, wie in bisherigen Färbungen, mit 1x PBS versehen. Die restlichen Färbeschritte entsprachen den Abläufen wie bereits unter 2.3.32.3.3 geschildert.

2.3.6 RHAMM

Zur immunhistochemischen Darstellung von RHAMM wurde eine Färbung mit einem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen (1:50; Spring Bioscience) mit einem Zweitantikörper aus der Ziege (1:200; Alexa Fluor 488) durchgeführt. Auch bei dieser Färbung erfolgte zunächst eine Unterteilung in zwei Untergruppen (a und b), von denen eine einer Permeabilisierung unterzogen wurde. Wie unter 2.3.52.3.5 wurde für diese Untergruppe (b) die 1x PBS-Lösung mit 0,05% Tween®20 versetzt. Die Untergruppe (a) wurde wie oben beschrieben nach dem standardisierten Färbeprotokoll gefärbt.

2.4 Mikroskopie und Bildverarbeitung

2.4.1 Hard- und Software

Mit dem Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Axio Imager.M2, Carl Zeiss) und der dazugehörigen Software (AxioVision, Version 4.8.2) wurden Aufnahmen von neun definierten Ausschnitten pro Ebene (siehe Abbildung 9) angefertigt.

Die Verarbeitung der mikroskopischen Aufnahmen und Datenerhebung erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware Fiji (Fiji Is Just ImageJ, Version 2.0.0-rc-43/1.51h).¹⁰⁴

Die statistische Auswertung und Darstellung der erhobenen Daten in Diagrammform erfolgte mit Excel (Microsoft; Redmond, WA, USA) und GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., Version 9.2.0, La Jolla, CA, USA).

2.4.2 Anatomische Unterteilung

Die anatomische Unterteilung der fünf Ebenen erfolgte wie unter Abbildung 9 2.2.3 beschrieben nach definierten Vorgaben^{Fehler! Textmarke nicht definiert.}, um die Vergleichbarkeit sicherzustellen und die Ergebnisse mit präliminären Daten abgleichen zu können.

Zur Orientierung beim Aufsuchen der zu analysierenden Ausschnitte dienten die großen Arterien (in Abbildung 9 mit „*“ gekennzeichnet) als Referenzpunkte. Darüber hinaus erfolgte eine Sektionierung in ein dem Hinterlaufknochen zugewandtes, ein zur Haut gerichtetes, sowie ein zwischen diesen Bereichen liegendes Areal. Im Folgendem wurden diese als „hautwärts“, „mittig“ und „knochenwärts“ bezeichnet.

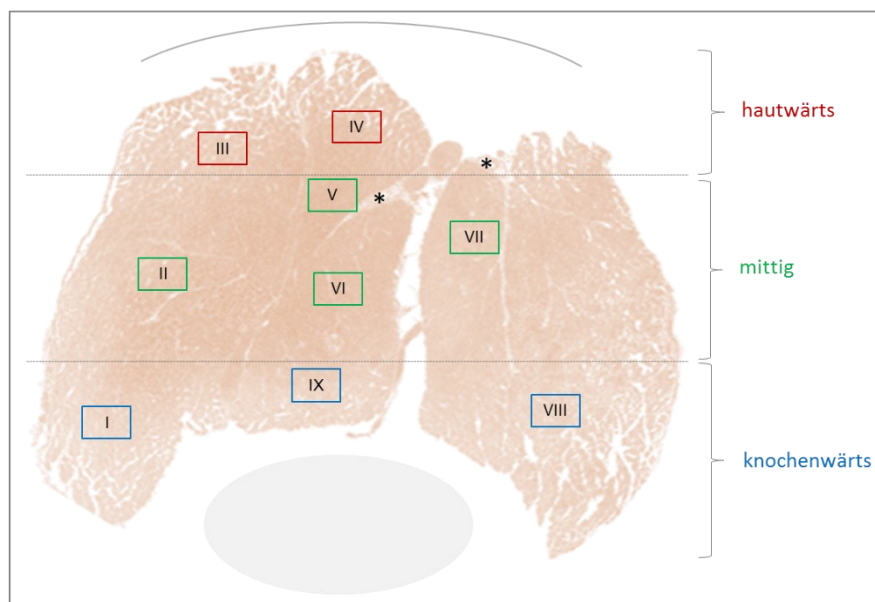


Abbildung 9: Anatomische Unterteilung der Abschnitte I-IX

Exemplarische Darstellung der anatomischen Unterteilung der vordefinierten Abschnitte I-IX im Querschnitt (horizontale Ebene) durch den murinen Hinterlaufmuskel. Mit Rot sind die Abschnitte III und IV im hautwärts gerichteten Bereich des Muskels markiert; grün stellt die im mittleren Segment befindlichen Abschnitte II, V, VI, VII dar; blau kennzeichnet die Abschnitte I, VIII und IX, die sich im knochenwärts gelegenen Muskelbereich befinden.

2.4.3 Bestimmung der basalen Kapillar- und Muskelfibrillenanzahl

Zur Bestimmung der Kapillardichte wurde die Anzahl der CD31-positiven Signale in den CD31/ α SMA doppelgefärbten Schnitten pro Bildausschnitt bestimmt. Dies

erfolgte durch eine automatische und manuelle Auszählung mittels der Software Fiji.

Für die automatische Auszählung wurde zunächst der entsprechende Ausschnitt (I-IX der fünf Ebenen) im Rhodamin-Kanal in die 8-bit Version konvertiert und die korrekte Skalierung festgelegt (Abbildung 10). Anschließend erfolgte die Auswahl des verbindlichen Schwellenwerts für die Bestimmung der detektierten Bereiche in den zu analysierenden Bildern. Zudem wurde festgelegt, dass ausschließlich CD31-positive Signale größer als $1 \mu\text{m}^2$ einbezogen werden, um die gewertete Anzahl der artifiziellen Markierungen möglichst geringzuhalten. Zusätzlich wird die prozentuale Fläche der CD31-positiven Signale bestimmt.

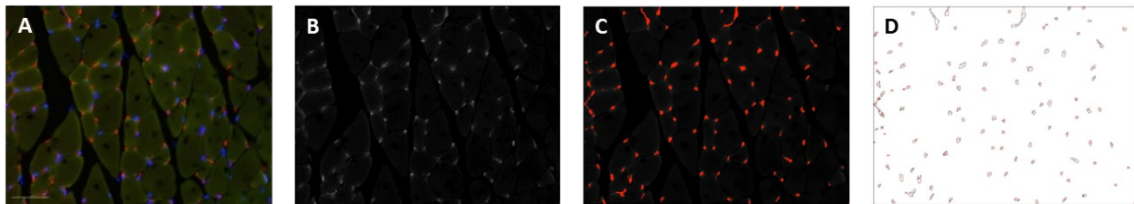


Abbildung 10: Automatische Auszählung der Kapillaren

Exemplarische Darstellung der automatischen Auszählung der Kapillaren mittels der Software Fiji. **A** Originalbild (Maßstabsbalken entspricht $50 \mu\text{m}$) **B** 8-bit-Bild **C** Analysebild bei festgelegtem Schwellenwert **D** Ergebnisbild.

Zur Validierung der automatisierten Auswertung wurde eine manuelle Auszählung der Kapillaren und Muskelfibrillen mit dem *Cell counter*-Plugin der Software Fiji durchgeführt. Nach Initialisierung des Bildes erfolgte die Zählung der jeweiligen Strukturen mit verschiedenfarbigen Markern (Abbildung 11). Gezählt wurden ausschließlich CD31-positive Strukturen, deren Fläche weniger als $30 \mu\text{m}^2$ betrug (Abbildung 12). Strukturen unter $30 \mu\text{m}^2$ mit einem positiven Signal für CD31 als auch für α -SMA wurden als Arteriolen eingestuft und separat aufgelistet.

Das Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfibrillen wurde anhand der jeweiligen Gesamtanzahl pro Gesichtsfeld (Abbildung 11) errechnet.

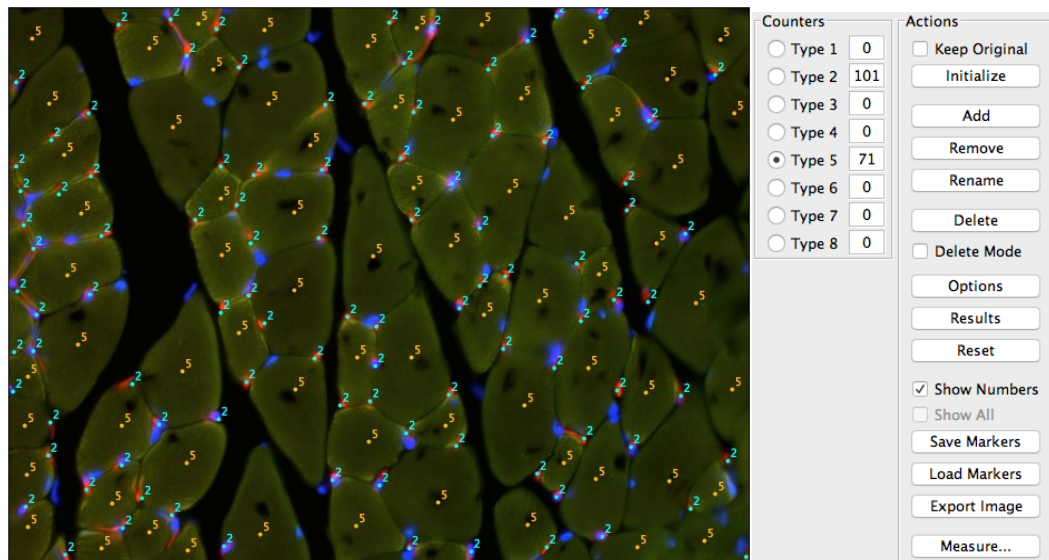


Abbildung 11: Manuelle Auszählung der Kapillaren und Muskelfibrillen

Exemplarische Darstellung der manuellen Auszählung der Kapillaren (mit „2“ markiert) und Muskelfibrillen (mit „5“ markiert) mittels der Software *Fiji*.

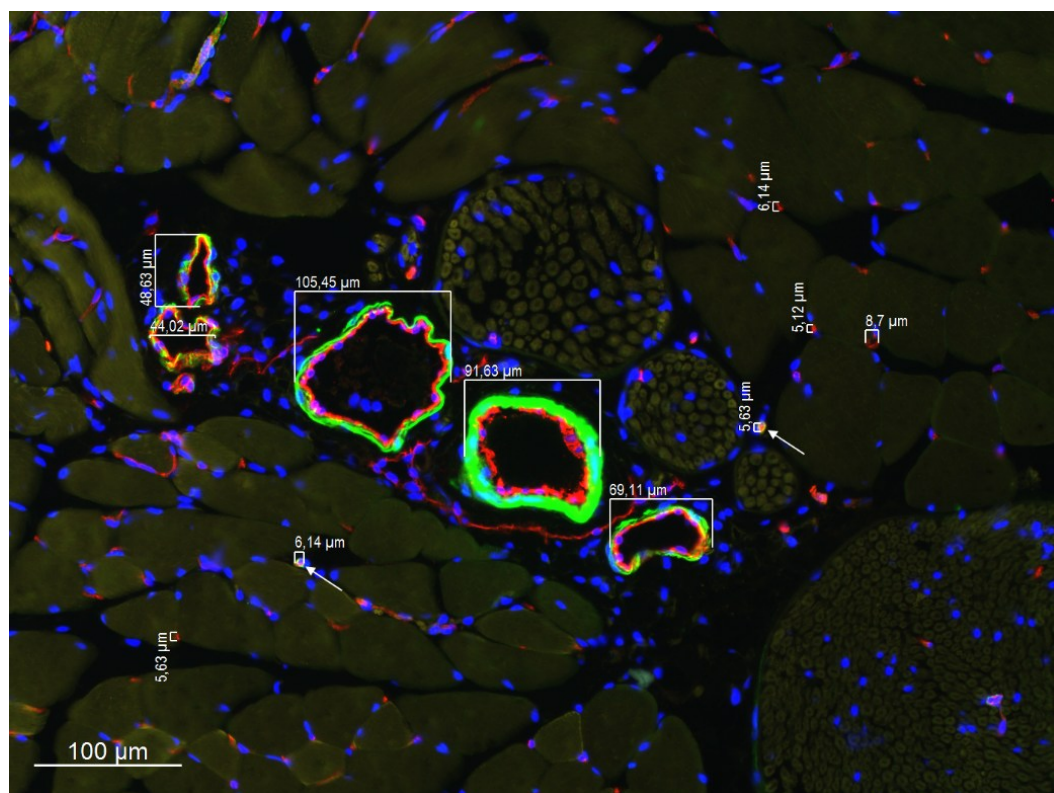


Abbildung 12: Größenverhältnisse der Blutgefäße im murinen Hinterlauf

Dargestellt sind Blutgefäße in einem exemplarischen Bildausschnitt einer CD31/ α -SMA-Doppelfärbung der murinen Hinterlaufmuskulatur. Kapillaren stellen sich mit einem Gefäßdurchmesser von ca. 5-10 μm dar. Mit Pfeil markiert sind präkapilläre Arteriolen/Kapillaren mit angelagertem Perizyten. Kleine und mittelgroße Arterien sind mit einem Durchmesser von 50-100 μm ($\pm 5 \mu\text{m}$) abgebildet.

2.4.4 Bestimmung des Hyaluronsäuregehalts

Zur Quantifizierung des Hyaluronsäuregehaltes wurden von den mikroskopischen Aufnahmen der HA-gefärbten Schnitte mittels Fiji zunächst das bräunliche „DAB+H“-Bild (*Color Deconvolution*) ausgewählt und ein Schwellenwert für die Markierung der entsprechenden Signale verbindlich für die Ebenen festgelegt. Anschließend wurde die prozentuale Fläche der positiv markierten Strukturen bestimmt und festgehalten (Abbildung 13).

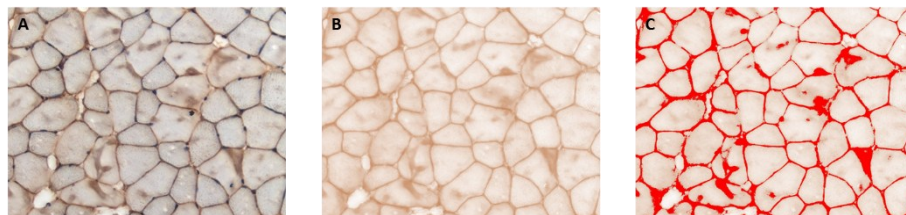


Abbildung 13: Quantifizierung der perifibrillären Hyaluronsäure

Exemplarische Darstellung der Verarbeitung eines Bildausschnitts aus einem HA-gefärbten murinen Hinterlaufmuskel. **A** Gefärbter Gewebeausschnitt im Original. **B-C** Bildverarbeitung mittels der Software Fiji: *Color deconvolution* (**B**) und Markierung der gefärbten Fläche (**C**).

2.4.5 Evaluation Verteilung der Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM

Die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM konnten im murinen Skelettmuskel durch immunhistochemische Färbungen nicht detektiert werden.

Vorgesehen war eine Messung in den o.g. verschiedenen anatomischen Bereichen, in denen bereits die Gefäße, Muskelfibrillen und HA quantifiziert wurden. Diese sollten dann miteinander ins Verhältnis gesetzt werden.

Anzumerken ist, dass zwischen den Muskelfibrillen befindliche Strukturen angefärbt werden konnten. Diese lagen in unterschiedlicher Dichte vor. Abbildung 14 zeigt exemplarisch eine CD44-Färbung mittels Erstantikörper aus dem Kaninchen (1:50; Sigma Prestige *antibodies anti-CD44*) mit einem Zweitantikörper aus der Ziege (1:200; Alexa Fluor 488 *anti-rabbit*) ohne Permeabilisierungsschritt. Zur weiteren Differenzierung und Abgrenzung erfolgten ergänzende Färbungen, die unter 5.3 im Appendix detailliert beschrieben werden.

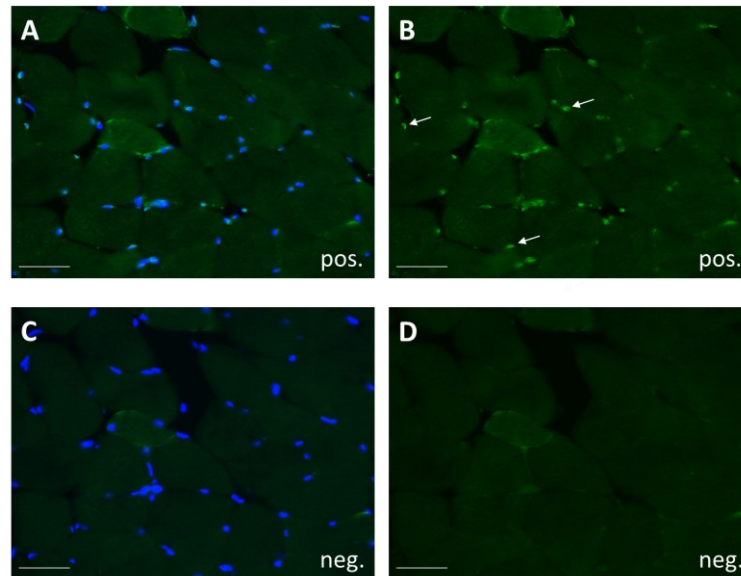


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung einer CD44-Färbung

Immunhistochemische Färbung von murinem Hinterlaufmuskelgewebe mittels eines anti-CD44-Antikörpers (grün), Kernfärbung mit DAPI (blau) mit Negativkontrolle (C+D). In **B** beispielhaft mit Pfeil markierte angefärbte Strukturen zwischen den Muskelfibrillen liegend. **A+C** Darstellung in 2-Kanal-Aufnahme (eGFP+DAPI). **B+D** Darstellung im Grünkanal (eGFP). Skalierung 50 μ m.

2.5 Analyse der Genexpression

2.5.1 Isolation der Boten-Ribonukleinsäure und reverse Transkription

Zur Vorbereitung der Boten-Ribonukleinsäuren(mRNA)-Isolation wurde zunächst das Arbeitsmaterial (Pinzette) von Ribonukleasen (RNasen) befreit, indem dieses in 0,1 M Natriumhydroxid (NaOH) getaucht und anschließend mit Reinstwasser (Milli-Q®) gewaschen wurde. Mit dieser Pinzette wurde das entnommene murine Hinterlaufmuskelgewebe in ein M-Tube® überführt. Durch die Zugabe von 1 ml peqGOLD TriFast™ und der mechanischen Zerkleinerung mit dem Dissociator konnte das Gewebe lysiert und homogenisiert werden. Die entstandene Suspension wurde zur weiteren Verarbeitung in ein 2 ml-Eppendorf-Tube gegeben. Durch die Zuführung von 200 μ l Chloroform konnte, nach ausgiebiger Durchmischung und anschließender Zentrifugation für zehn Minuten mit 13.200 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei 20 °C, eine Phasenseparation herbeigeführt werden. Dabei fanden sich Proteine in der organischen Unterphase, DNA in der Zwischenphase und RNA in der wässrigen Oberphase. Anschließend wurde die RNA-haltige Schicht vorsichtig abpipettiert und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Tube überführt. Die Fällung der RNA wurde durch Zugabe von 400 μ l Isopropanol und 60-minütiger Zentrifugation

mit 13.200 rpm pro Minute bei 4 °C erreicht. Nach vorsichtigem Absaugen des flüssigen Überstands wurde die RNA gewaschen, indem sie mit 1 ml 75 % Ethanol erneut für 10 Minuten mit 13.200 rpm bei 4 °C zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der flüssige Überstand vorsichtig abgesaugt und die Eppendorf-Tubes unter dem Abzug belassen, bis das entstandene RNA-Pellet getrocknet war. Daraufhin wurde die RNA durch Hinzufügen von 20 µl RNase-freien Reinstwassers und Erwärmung auf 65 °C für fünf Minuten unter leichtem Schütteln resuspendiert. Abschließend wurden die Proben am NanoDrop-1000-Spektrophotometer auf die Qualität und Quantität geprüft. Da für das Umschreiben der RNA in cDNA 1000 ng RNA auf 12 µl Lösung benötigt wurden, wurden die Proben dementsprechend berechnet und die RNA-Suspension verdünnt. Das Umschreiben erfolgte mittels des *QuantiTect Reverse Transcription Kits*. Dazu wurden die Proben zunächst mit 2 µl *DNA-wipeout* versehen und für zwei Minuten in den *cDNA-Cycler* gegeben. Jeder Probe wurde anschließend unter Kühlung 6 µl Mastermix (4 µl Puffer, 1 µl Nukleotide, 1 µl reverse Transkriptase) zugefügt und das *cDNA-Cycler*-Programm nach Herstellerprotokoll fortgesetzt. Nach Abschluss der Umschreibung wurden die Proben auf eine 100 µl-Menge mit doppelt destilliertem Wasser aufgefüllt und bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.5.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) erfolgte unter Verwendung von Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Thermo Fisher) und einem DNA-bindendem Farbstoff in einem *Real-Time*-PCR-System (Life Technologies). Die hierfür verwendeten Primer-Sequenzen wurden in Tabelle 9 aufgeführt.¹⁰⁵

Tabelle 9: Primer und Primersequenzen

Gen	Vorwärtsprimer 5'-3'	Rückwärtsprimer 3'-5'
<i>Has1</i>	TATGCTACCAAGTATACCTCG	TCTCGGAAGTAAGATTTGGAC
<i>Has2</i>	CAAAAATGGGGTGGAAAGAG	ACAGATGAGGCAGGGTCAAG
<i>Has3</i>	CTCAGTGGACTACATCCAGG	GACATCTCTCCAACACCTC
<i>Cd44</i>	GACCGGTTACCATAACTATTGTC	CATCGATGTCTTCTTGGTGTG
<i>Rhamm</i>	GCAGAAGGAGGAGCAGAGTG	GGCGTGAGCAGCAATATGT
<i>Hyal1</i>	GAAATGACAGATTATCTTCTGCCC	TTGTCTGAGCTTAGCCAGAG
<i>Hyal2</i>	GGTGGACCTTATCTCTACCAT	TATTGGCAGGTCTCCATACTT
<i>18s rRNA</i>	GCAATTATTCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., Version 9.2.0, La Jolla, California, USA).

Zu diesem Zweck wurden die erhobenen Daten aus den Bildausschnitten I-IX jeder Ebene mit einem ungepaarten t-Test unter Einbeziehung des Standardfehlers (SEM) ausgewertet. Anschließend wurden die einzelnen Ebenen miteinander ins Verhältnis gesetzt. Zudem erfolgte eine differenzierte Auswertung der Bereiche „hautwärts“, „mittig“ und „knochenwärts“ für Kapillar- und Muskelfibrillenanzahl sowie die prozentuale Fläche der gefärbten HA.

Es wurde von einer Normalverteilung ausgegangen und folglich ein parametrisches Testdesign gewählt.

Die Auswertungen der RNA-Expressionsanalyse erfolgten aufgrund der geringen Probengröße mittels gepaartem t-Test.

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung der Kapillardichte und Muskelfibrillenanzahl

3.1.1 Vergleich der Kapillaranzahl des linken und rechten Hinterlaufs

Präliminäre Untersuchungen der Gewebepfusion nach induzierter Ischämie des linken Hinterlaufs zeigten eine reduzierte Rekonstituierung des Blutflusses und eine verminderte Kapillarisierung. Dabei wurde der ischämische (linke) Hinterlauf mit dem nicht ischämischen (rechten) verglichen.

In Abbildung 15 und Abbildung 16 wurden die Ergebnisse zur Untersuchung der nicht beeinflussten, basalen (Durchblutungs-)Situation von linken und rechten Hinterläufen der Wildtyp- und *Has3-knockout*-Mäuse im Vergleich dargestellt, um zunächst die grundsätzliche These der Vergleichbarkeit von Hinterläufen aus einem Versuchstier zu untermauern.

Als Parameter wurden die Anzahl der Kapillaren und Muskelfibrillen an initial jeweils drei Hinterlaufmuskelpreparaten (WT und KO) untersucht und als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM) dargestellt.

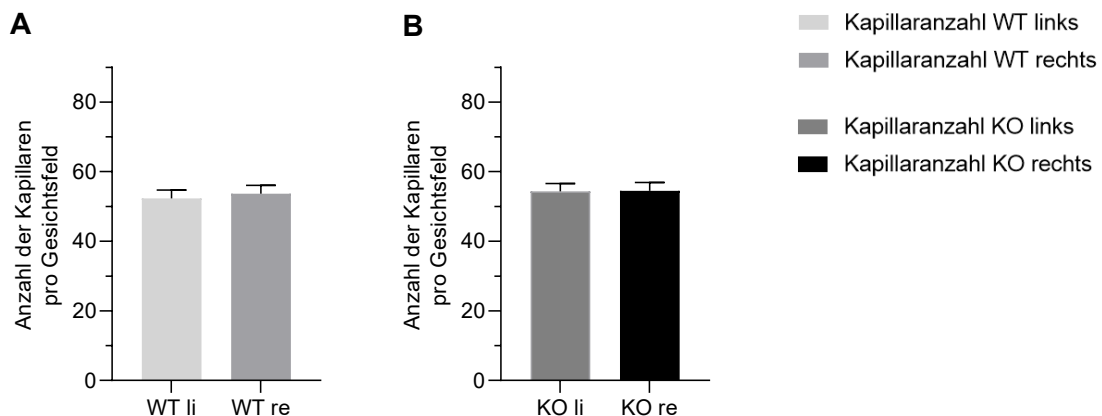


Abbildung 15: Vergleich der gemittelten Kapillaranzahl des linken und rechten Hinterlaufs

Quantitative Auswertung der Kapillaren von Wildtyp-Kontrollen (WT) **(A)** und *Has3-knockout*-Mäusen (KO) **(B)** im Vergleich des linken und rechten Hinterlaufs. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM der manuell ausgezählten Strukturen aus den Bildausschnitten I-IX der fünf definierten Ebenen bei $n=3$.

Die gemittelte Kapillaranzahl der WT lag links bei 52,3 ($\pm$ 2,39) im Vergleich zu rechts 53,6 ($\pm$ 2,41) Kapillaren pro Gesichtsfeld. Bei den *Has3-knockout*-Mäusen lag die gemittelte Anzahl der Kapillaren links bei 54,4 ($\pm$ 2,22) und rechts 54,5 ($\pm$ 2,39) Kapillaren pro Gesichtsfeld (bei $n=3$).

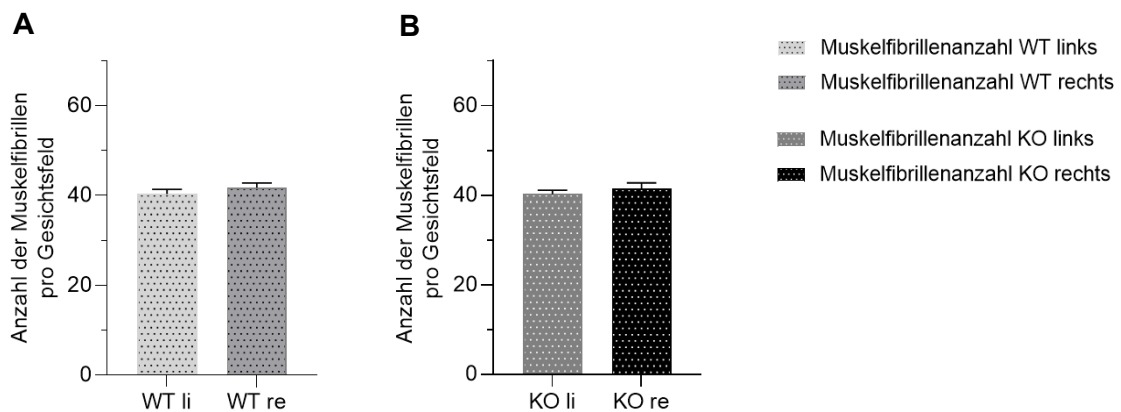


Abbildung 16: Vergleich gemittelte Muskelfibrillenanzahl des linken und rechten Hinterlaufs

Quantitative Auswertung der Muskelfibrillen von Wildtyp-Kontrollen (WT) **(A)** und *Has3-knockout*-Mäusen (KO) **(B)** im Vergleich des linken und rechten Hinterlaufs. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM der manuell ausgezählten Strukturen aus den Bildausschnitten I-IX der fünf definierten Ebenen bei n=3.

Die gemittelte Anzahl der Muskelfibrillen der WT lag links bei 40,3 ($\pm 1,0$) im Vergleich zu rechts 41,65 ($\pm 1,09$) Muskelfibrillen pro Gesichtsfeld. Bei den *Has3-knockout*-Mäusen lag die gemittelte Anzahl der Muskelfibrillen links bei 40,2 ($\pm 0,87$) und rechts 41,37 ($\pm 1,35$) Muskelfibrillen pro Gesichtsfeld (n=3).

Es konnte somit nachgewiesen werden, dass kein Unterschied bezüglich der erhobenen Parameter zwischen dem linken und rechten Hinterlauf von *Has3-knockout*-Mäusen und den Wildtyp-Kontrollen, über eine anatomische Varianz hinaus, vorlag.

Weitere Untersuchungen erfolgten daraufhin ausschließlich an den linken Hinterlaufmuskelpreparaten (in Anlehnung an die arbeitsgruppeninternen Untersuchungen der Ischämie-bedingten Auswirkungen am linken Hinterlauf).

3.1.2 Detaillierte Untersuchung der Kapillaranzahl und -verteilung

Die Quantifizierung der Kapillaren erfolgte, wie unter 2.4.3 beschrieben, mittels manueller und automatisierter Erfassung (Abbildung 17).

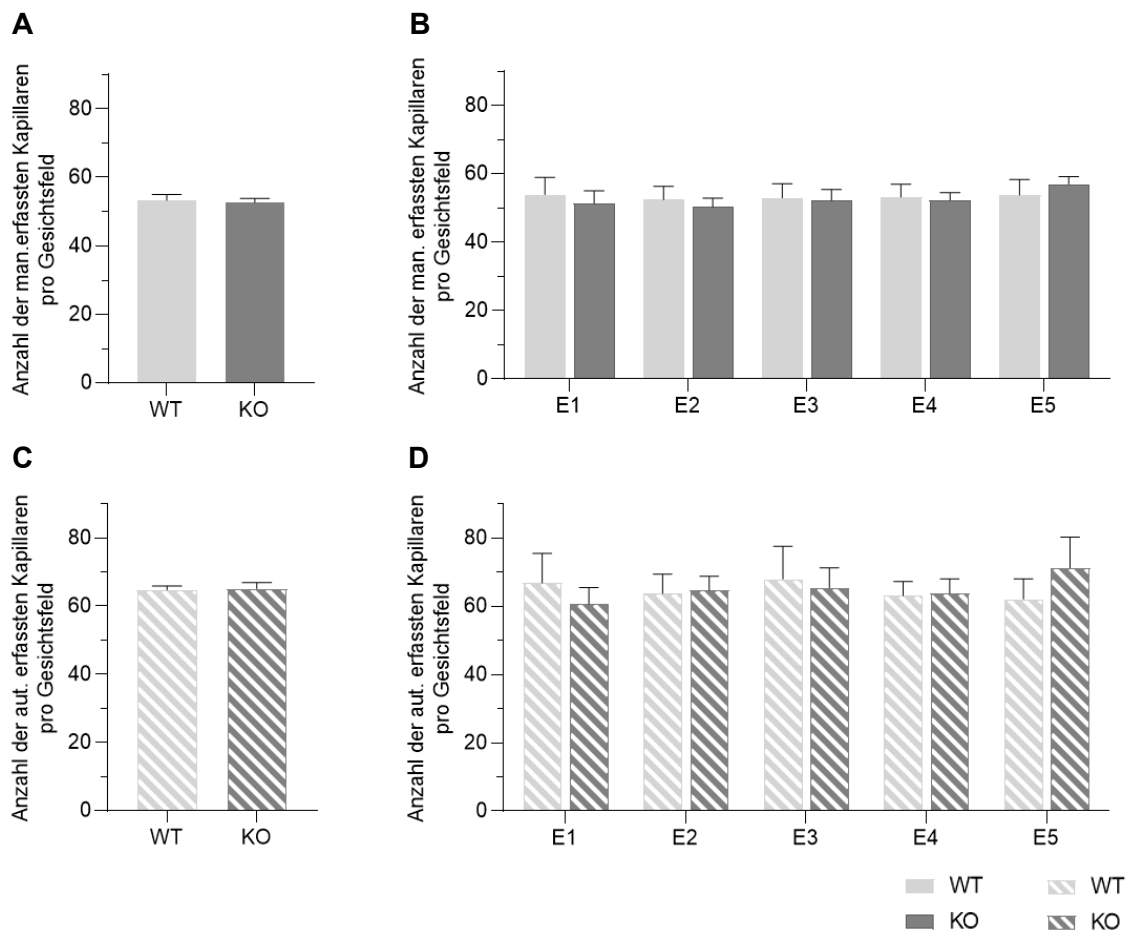


Abbildung 17: Quantifizierung der Kapillaranzahl in Hinterlaufmuskulatur von *Has3-knockout*-Mäusen und Wildtypkontrollen

Dargestellt sind die Mittelwerte ($\pm$ SEM) der Kapillaren pro Gesichtsfeld von Wildtyp-Kontrollen (WT) und *Has3-knockout*-Mäusen (KO) der manuell (**A+B**) und automatisiert (**C+D**) erfassten Werte. **A** gemittelte Gesamtanzahl der manuell erfassten Kapillaren. **B** gemittelte Anzahl der einzelnen Ebenen (E1-E5) der manuell erfassten Kapillaren.

C gemittelte Gesamtanzahl der automatisiert erfassten Kapillaren. **D** gemittelte Anzahl der einzelnen Ebenen (E1-E5) der automatisiert erfassten Kapillaren. $n=6$ (Erfassung mittels der Software *Fiji*).

Es zeigte sich, dass die Kapillaranzahl (Mittelwert $\pm$ SEM) in den untersuchten Proben ($n=6$) keine wesentlichen Unterschiede zwischen WT- und *Has3-knockout*-Mäusen ergab: Die manuell erfasste gemittelte Kapillaranzahl lag bei den WT mit $53,27 (\pm 1,77)$ im Vergleich zu den KO bei $52,67 (\pm 1,24)$ pro Bildausschnitt. Anhand der automatisierten Quantifizierung lagen die erhobenen Mittelwerte der Kapillaranzahl bei den WT bei $64,79 (\pm 1,13)$ und bei den KO bei $65,16 (\pm 1,74)$.

Zur Verdeutlichung der quantitativen Differenz zwischen dem manuellen und automatisierten Modus wurde die Gesamtanzahl der manuell erfassten Werte von

WT und KO (52,97) den automatisiert erhobenen (64,98) gegenübergestellt (Abbildung 18). Es ergab sich ein Unterschied von 12,16 ($\pm 3,31$) Kapillaren/Gesichtsfeld, entsprechend einer bis zu 25 %igen Abweichung im Vergleich zur manuellen Erhebung. Da die Differenz von entscheidendem Ausmaß war und zudem eine breitere Streuung aufwies, wurde folgend auf eine automatisierte Darstellung verzichtet und nur die manuelle Erhebung geltend gemacht.

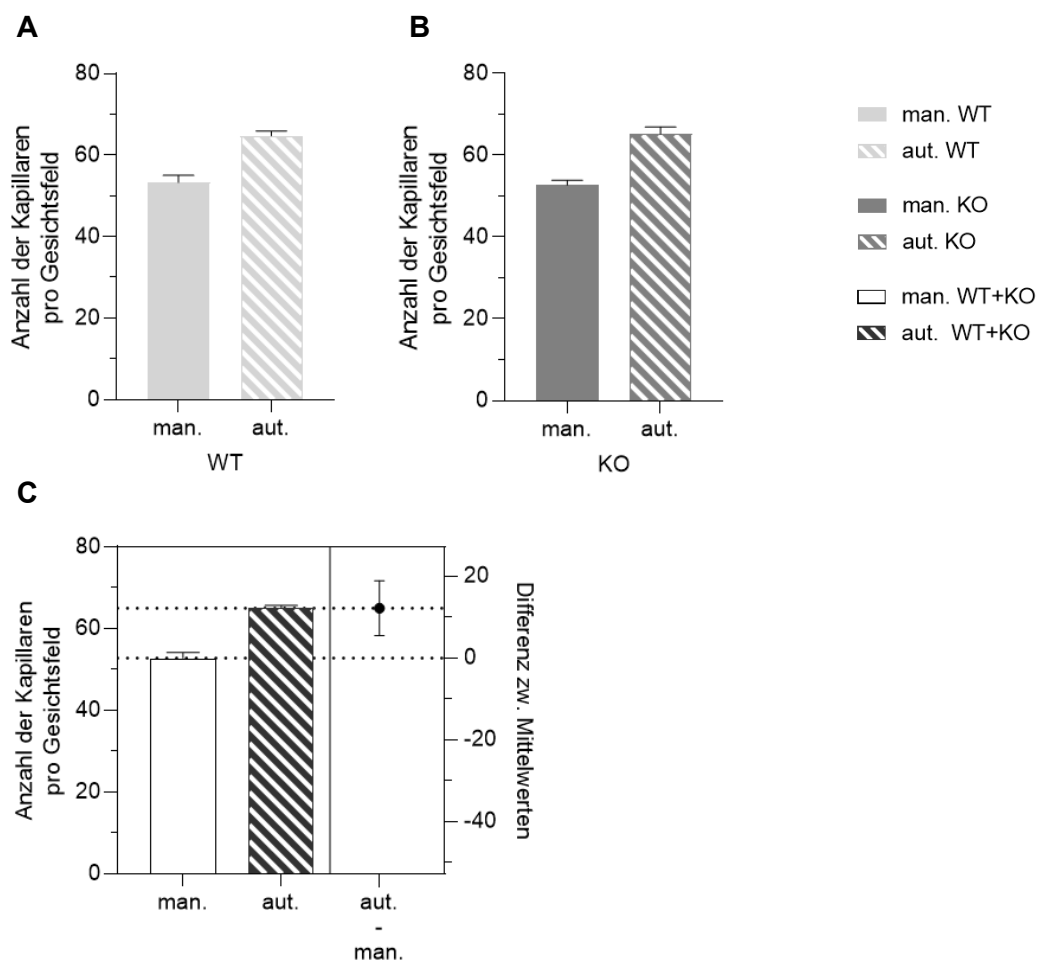


Abbildung 18: Vergleich von manueller und automatisierter Erfassung der Kapillaranzahl

Dargestellt ist die gemittelte Anzahl der Kapillaren pro Gesichtsfeld von Wildtyp-Kontrollen (WT) und *Has3-knockout*-Mäusen (KO) anhand manueller (man.) vs. automatisierter (aut.) Erfassung (Mittelwerte $\pm$ SEM) bei $n=6$ (Erfassung mittels der Software *Fiji*).

A Vergleich manuell und automatisiert erfasster Werte der Wildtyp-Kontrollen (WT). **B** Vergleich manuell und automatisiert erfasster Werte der *Has3-knockout*-Mäuse (KO). **C** Vergleich der gesamten gemittelten Kapillaranzahl pro Bildausschnitt (WT + KO) von manueller zu automatisierter Erfassung mit Darstellung der Differenz zwischen den Mittelwerten.

Eine weitere Quantifizierungsoption für Kapillaren bot die in vielen Untersuchungen gängige Feststellung der kumulativen Fläche CD31-positiv detektierter Strukturen in Prozentangaben, die in Abbildung 19 dargestellt ist.

Für diese Arbeit wurden nur Daten der manuellen Erfassungsmethode berücksichtigt, aufgrund der geringeren Streuung und genaueren Ergebnisse. Insbesondere bei Anschnitten in denen Kapillaren zirkulär um Muskelfibrillen verlaufen sind, zeigte sich die kumulative prozentuale Fläche im Vergleich zur Kapillaranzahl unverhältnismäßig erhöht.

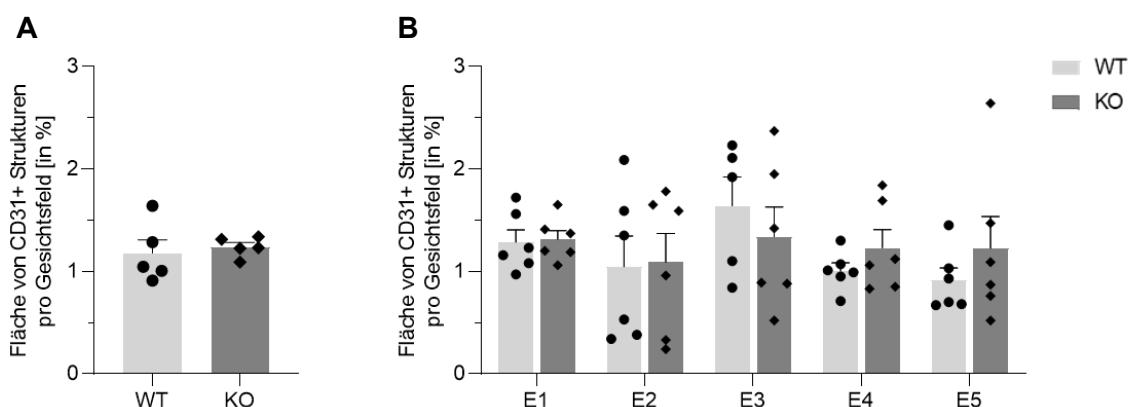


Abbildung 19: Quantifizierung der Kapillaren anhand der CD31-positiv markierten Fläche

Dargestellt ist die Quantifizierung der Kapillaren anhand der CD31-positiv markierten Fläche in Prozent pro Bildausschnitt bei $n=6$. **A** Mittelwert $\pm$ SEM über die definierten fünf Ebenen (E1-E5). **B** Darstellung pro Ebene (E1-E5) (Mittelwert $\pm$ SEM) pro Versuchstier. $n=6$.

Zur Analyse der quantitativen Verteilung der Kapillaren innerhalb der murinen Präparate wurde die Hinterlaufmuskulatur weiterführend strukturiert untersucht. Initial erfolgte die Feststellung des Mittelwerts über die Gesamtzahl der Proben und anschließend die Auswertung von proximal nach distal anhand der fünf definierten Ebenen (E1-E5) (Abbildung 17). Hier zeigte sich eine weitestgehend gleichmäßige Verteilung. Nun wurde eine Untersuchung der Bereiche „hautwärts“, „mittig“ und „knochenwärts“ innerhalb der einzelnen Ebenen (horizontal) vorgenommen, wie Abbildung 20 zeigt. Es stellten sich deutliche Unterschiede der Quantität innerhalb einer Ebene dar: die Kapillardichte nahm von hautwärts zu knochenwärts signifikant zu. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zwischen den Wildtypkontrollen und den *Has3-knockout*-Mäusen.

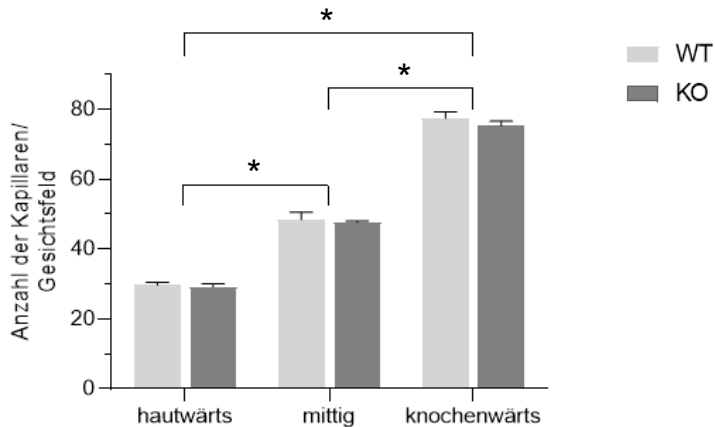


Abbildung 20: Quantifizierung der Kapillaren innerhalb der horizontalen Ebene

Quantifizierung der Kapillaranzahl in den Bereichen „hautwärts“, „mittig“ und „knochenwärts“ im Vergleich von Wildtyp-Kontrollen (WT) zu den *Has3-knockout*-Mäusen (KO). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus den Bildausschnitten I-IX gemittelt über die untersuchten definierten Ebenen 1-5 bei $n=6$. Eine Signifikanz (*) wurde bei $p<0,05$ angenommen.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, wies der Bereich „hautwärts“ eine signifikant geringere Kapillaranzahl (Mittelwert $\pm$ SEM) mit $29,4 \pm 0,72$ (WT: $29,66 \pm 0,8$; KO: $29,15 \pm 0,92$) im Vergleich zum Bereich „mittig“ mit $47,99 \pm 1,16$ (WT: $48,41 \pm 2,1$; KO: $47,57 \pm 0,5$) sowie zum Bereich „knochenwärts“ mit $76,32 \pm 1,19$ (WT: $77,41 \pm 1,91$; KO: $75,23 \pm 1,41$) auf. Der Unterschied der Kapillaranzahl zwischen den Bereichen „hautwärts“ und „mittig“ lag bei $18,59 \pm 1,36$, zwischen „mittig“ und „knochenwärts“ bei $28,33 \pm 1,66$ und zwischen „hautwärts“ und „knochenwärts“ bei $46,92 \pm 1,39$.

3.1.3 Detaillierte Untersuchung der Muskelfibrillenanzahl und -verteilung

Im nächsten Schritt wurden die Muskelfibrillen quantifiziert und deren Verteilung über die fünf Ebenen sowie über die Bereiche „hautwärts“, „mittig“ und „knochenwärts“ innerhalb der horizontalen Ebenen untersucht (Abbildung 21).

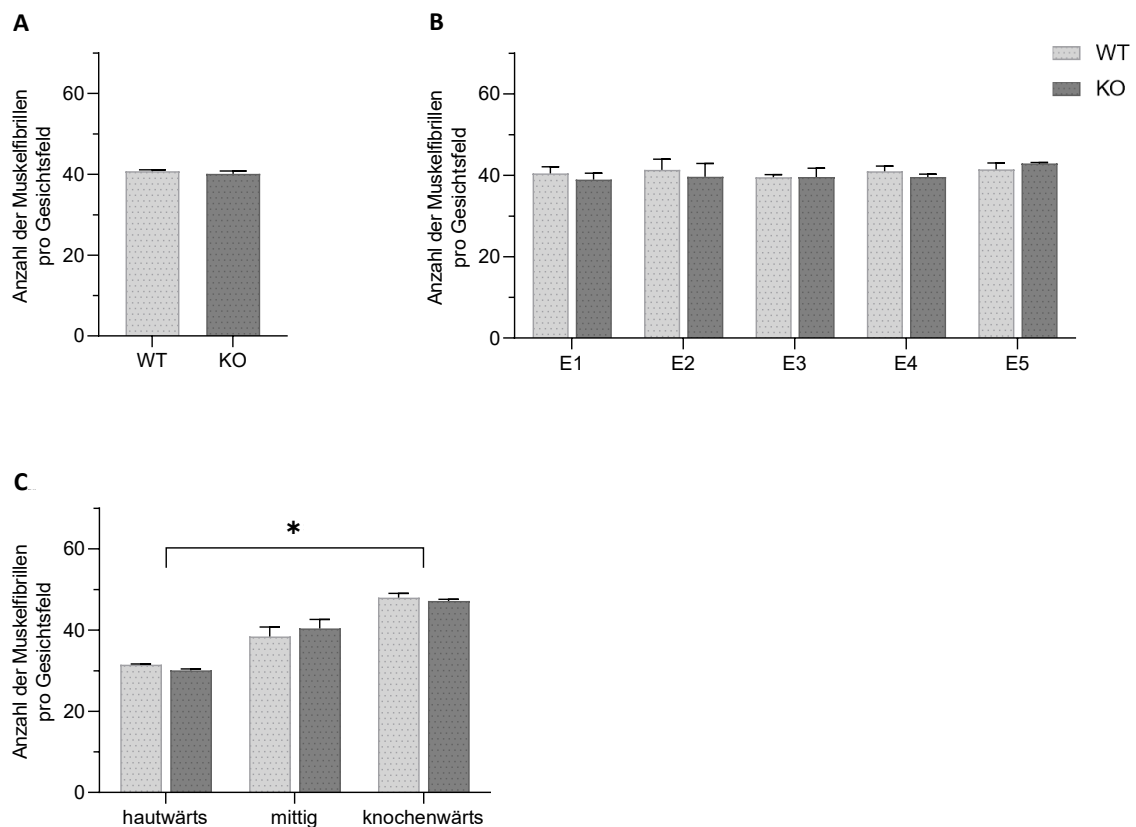


Abbildung 21: Verteilung der Muskelfibrillen

A Gemittelte Muskelfibrillenanzahl pro Bildausschnitt von Wildtyp-Kontrollen (WT) zu den *Has3-knockout*-Mäusen (KO) gesamt. **B** Quantifizierung der Muskelfibrillen in den Ebenen 1-5 (E1-E5) im Vergleich von WT zu KO.

C Unterteilung der Muskelfibrillenanzahl auf die Bereiche „hautwärts“, „mittig“ und „knochenwärts“. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus den Bildausschnitten I-IX bei $n=6$. Eine Signifikanz (*) wurde bei $p<0,05$ angenommen.

Ein signifikanter Unterschied ergab sich in der Muskelfibrillenverteilung innerhalb der horizontalen Unterteilung der Ebenen zwischen den regionalen Bereichen „hautwärts“ und „knochenwärts“. Die Differenz zeigte sich gleichermaßen bei Wildtyp- und den *Has3-knockout*-Mäusen.

Die gemittelte Anzahl der Muskelfibrillen pro Bildausschnitt im Bereich „hautwärts“ ergab $30,57 \pm 1,53$ (WT: $32,1 \pm 0,89$; KO: $29,03 \pm 0,67$); im Bereich „mittig“ lag der Wert bei $40,05 \pm 1,64$ (WT: $38,4 \pm 2,33$; KO: $40,96 \pm 2,63$); die als „knochenwärts“ definierte Region wies eine gemittelte Muskelfibrillenanzahl von $46,57 \pm 1,42$ (WT: $47,99 \pm 1,04$; KO: $45,14 \pm 1,62$) auf.

Der Unterschied zwischen „hautwärts“ und „mittig“, sowie „mittig“ und „knochenwärts“ wies einen Trend ohne Nachweis einer Signifikanz auf. Im Detail lag die Differenz der Muskelfibrillenanzahl pro Bildausschnitt im Vergleich von

„hautwärts“ zu „mittig“ bei $8,67 \pm 1,22$, zwischen „mittig“ und „knochenwärts“ bei $6,89 \pm 1,91$ und zwischen „hautwärts“ und „knochenwärts“ bei $15,82 \pm 1,58$ Muskelfibrillen pro Bildausschnitt.

Kein signifikanter Unterschied konnte in der Anzahl der Muskelfibrillen pro Gesichtsfeld zwischen WT und KO festgestellt werden. Über die fünf Ebenen gemittelt ($\pm$ SEM) ergab sich bei den WT $40,75 \pm 0,36$ und bei den KO $40,12 \pm 0,7$ Muskelfibrillen pro Gesichtsfeld.

3.1.4 Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfibrillen

Ergänzend wurde die Anzahl der Kapillaren mit den Muskelfibrillen ins Verhältnis gesetzt, um eine quantitative Korrelation in der Verteilung darzustellen (Abbildung 22).

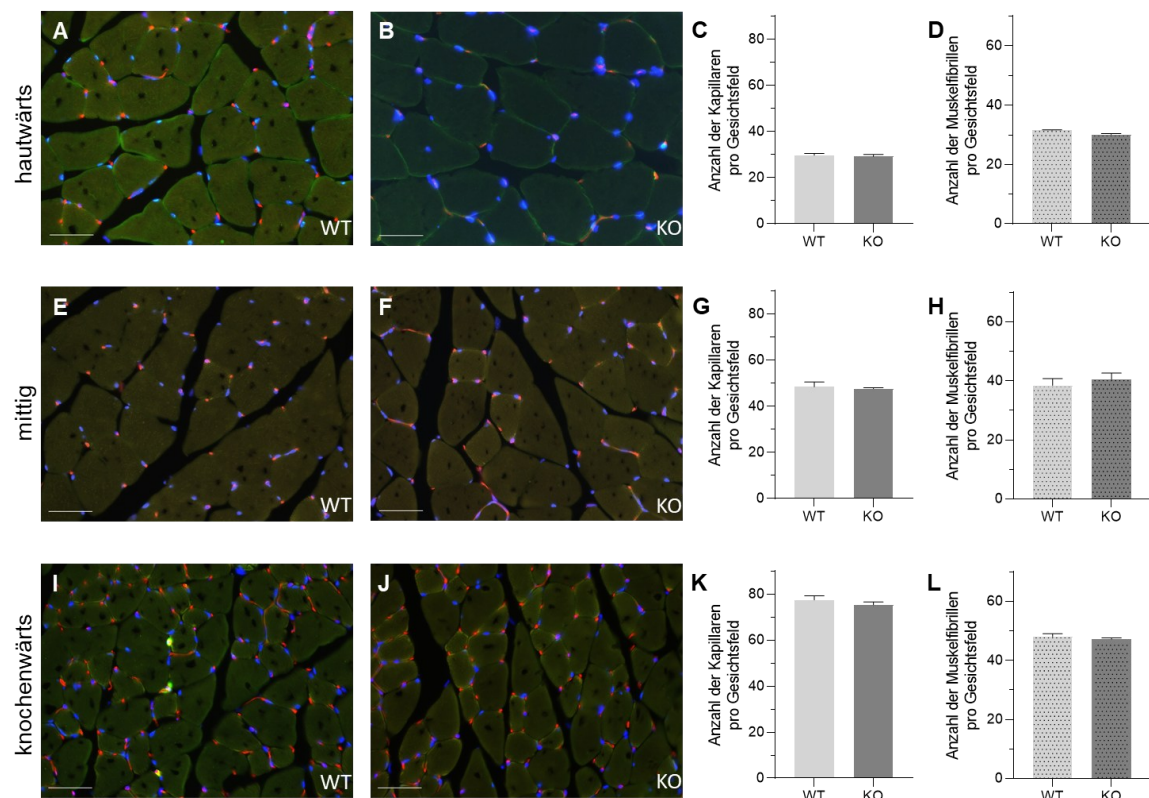


Abbildung 22: Verteilungsverhalten der Kapillaren und Muskelfibrillen auf horizontaler Ebene.

Vergleich der Verteilung von Kapillaren und Muskelfibrillen in der Hinterlaufmuskulatur von Wildtyp-Kontrollen (WT) zu *Has3-knockout*-Mäusen (KO) innerhalb der horizontalen Ebene in den Bereichen „hautwärts“, „mittig“ und „knochenwärts“. Dargestellt sind die gemittelten Parameter der fünf Ebenen (E1-E5) $\pm$ SEM pro Gesichtsfeld der jeweiligen Bereiche bei $n=6$; Größenmaß entspricht 50 μ m. Exemplarische Darstellung der Kapillaren und Muskelfibrillen im Bereich „hautwärts“ (Bildausschnitte III und IV) (A+B) mit dazugehörigen Daten (C+D), „mittig“ (Bildausschnitte II, V, VI, VII) (E+F) mit den dazugehörigen Daten (G+H) und „knochenwärts“ (Bildausschnitte I, VIII und IX) (I+J) mit den dazugehörigen Daten (K+L).

Da sich das Verteilungsverhalten für Kapillaren und Muskelfibrillen ähnlich verhielt, wurde die Anzahl der jeweiligen Parameter zu Übersichtszwecken miteinander ins Verhältnis gesetzt, wie Abbildung 23 in Form des Quotienten aus Kapillaren zu Muskelfibrillen zeigt.

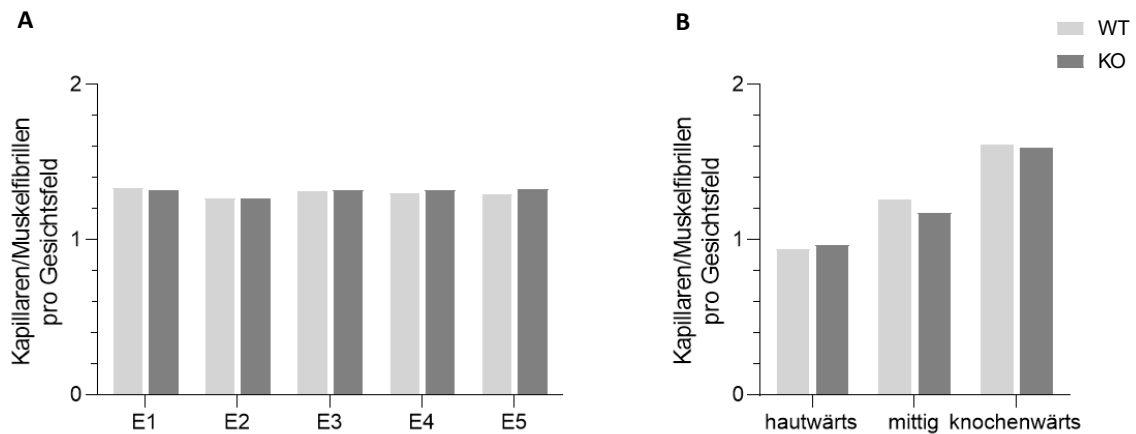


Abbildung 23: Kapillaren/Muskelfibrillen-Quotient

A Darstellung des Verhältnisses von Kapillaren pro Muskelfibrillen in den Ebenen 1-5 (E1-E5) im Vergleich von Wildtyp-Kontrollen (WT) zu *Has3-knockout*-Mäusen (KO). **B** Darstellung des Verhältnisses von Kapillaren pro Muskelfibrillen innerhalb der Bereiche „hautwärts“, „mittig“ und „knochenwärts“, gemittelt über die Ebenen 1-5 im Vergleich von Wildtyp-Kontrollen (WT) zu den *Has3-knockout*-Mäusen (KO).

Dargestellt sind die Quotienten der jeweiligen Mittelwerte der Bildausschnitten I-IX von Ebene 1-5 bei n=6.

Auch in dieser Darstellungsweise stellt sich kein Unterschied zwischen WT und KO dar. Sowohl Kapillaren als auch Muskelfibrillen wiesen nahe des Hinterlaufknochens die höchste Dichte auf, die in Richtung Haut gleichermaßen stetig abnahm.

Der Quotient von Kapillaren zu Muskelfibrillen ergab gemittelt über die Gesamtanzahl einen Wert von 1,3 Kapillaren pro Muskelfibrillen sowohl bei WT als auch bei den KO. Bezogen auf die einzelnen Bereiche lag der gemittelte Quotient von Kapillaren zu Muskelfibrillen „hautwärts“ bei 0,96, im Bereich „mittig“ bei 1,2 und „knochenwärts“ bei 1,6.

3.2 Quantifizierung der Hyaluronsäure

Zur Beurteilung des Hyaluronsäuregehalts und der Auswirkungen des *Has3-knockouts* wurde die perifibrillär vorliegende HA, die durch immunhistochemische Markierungen detektiert wurde, anhand der prozentualen Fläche pro Bildausschnitt gemessen und in folgendem Graphen (Abbildung 24) dargestellt.

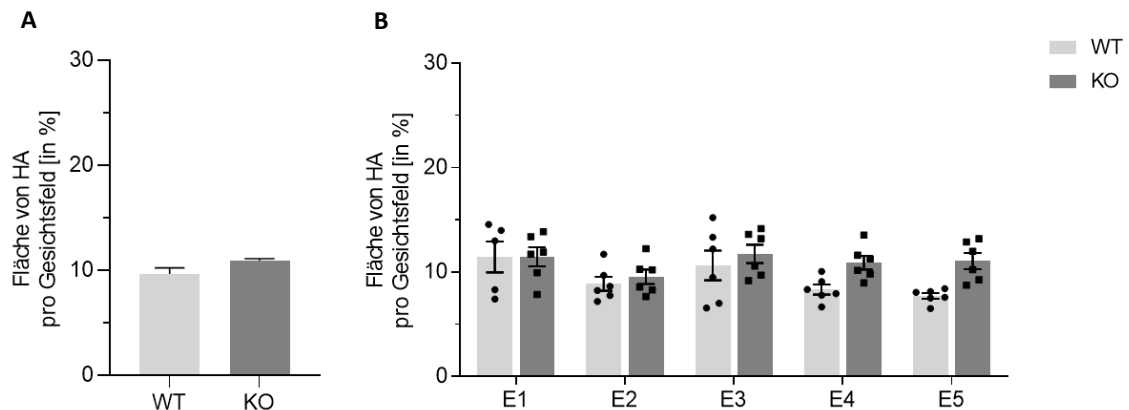


Abbildung 24: Quantifizierung des perifibrillären Hyaluronsäuregehalts

Dargestellt ist der perifibrilläre Hyaluronsäuregehalt gemessen anhand der prozentualen Fläche pro Bildausschnitt (I-IX) im Vergleich von Wildtyp-Kontrollen (WT) zu den *Has3-knockout*-Mäusen (KO) bei n=6. **A** Mittelwerte ± SEM gesamt. **B** Mittelwerte ± SEM pro Ebene 1-5 (E1-E5).

Auf histologischer Ebene ergab sich in der Gesamtübersicht eine prozentuale Fläche (Mittelwerte ± SEM) von $9,67 \pm 0,58$ bei den Wildtyp-Mäusen zu $10,93 \pm 0,19$ bei den *Has3-knockout*-Mäusen pro Gesichtsfeld, bei einer Differenz von $1,26 \pm 0,61$ in einem 95%-Konfidenzintervall von $-0,436$ bis $2,959$. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

Anzumerken ist, dass eine breite Streuung der erhobenen Daten vorlag, die anhand der Darstellung der Ebenen 1-5 (Abbildung 24 B), sowie der horizontalen Unterteilung der Ebenen (Abbildung 25) auffiel, wie anhand *scatter dot plots* demonstriert wurde. In der folgenden Abbildung wurde eine genauere Unterteilung auf der horizontalen Ebene durchgeführt.

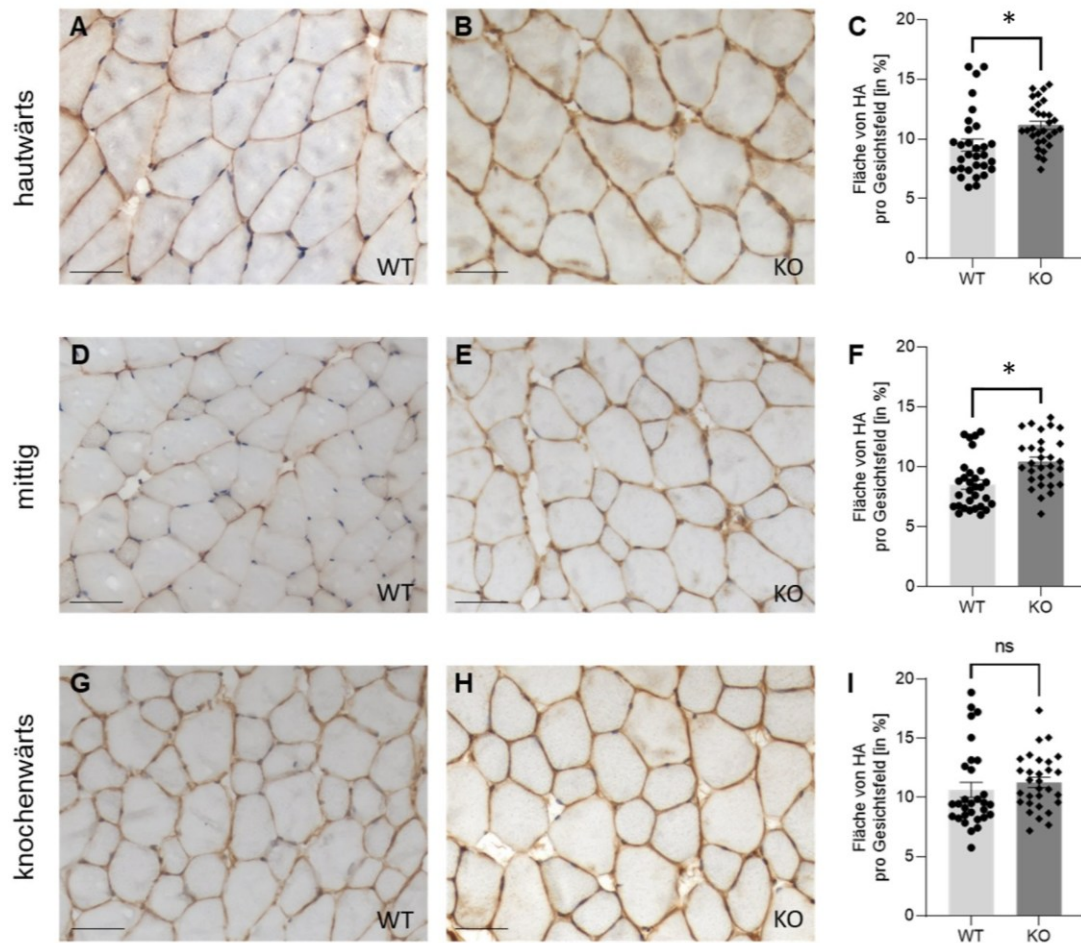


Abbildung 25: Verteilung der Hyaluronsäure auf horizontaler Ebene

Vergleich der perifibrillären Hyaluronsäureverteilung in der Hinterlaufmuskulatur von Wildtyp-Kontrollen (WT) zu *Has3-knockout*-Mäusen (KO) innerhalb der horizontalen Ebene in den Bereichen „hautwärts“, „mittig“ und „knochenwärts“. Dargestellt sind die Parameter der fünf Ebenen (E1-E5) $\pm$ SEM der jeweiligen Bereiche bei $n=6$. Größenmaß entspricht 50 μm .

A+B Exemplarische Darstellung der perifibrillären Hyaluronsäure im Bereich „hautwärts“ (Bildausschnitte III und IV); **C** Erhobene Daten zur prozentualen Fläche der Hyaluronsäure pro Bildausschnitt im Bereich „hautwärts“. **D+E** Exemplarische Darstellung der perifibrillären Hyaluronsäure im Bereich „mittig“ (Bildausschnitte II, V, VI, VII); **F** Erhobene Daten zur prozentualen Fläche der Hyaluronsäure pro Bildausschnitt im Bereich „mittig“. **G+H** Exemplarische Darstellung der perifibrillären Hyaluronsäure im Bereich „knochenwärts“ (Bildausschnitte I, VIII und IX); **I** Erhobene Daten zur prozentualen Fläche der Hyaluronsäure pro Bildausschnitt im Bereich „knochenwärts“. Eine Signifikanz (*) wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

Im Bereich „hautwärts“ lag der Mittelwert $\pm$ SEM bei $9,49 \pm 0,52$ für die WT und bei $11,15 \pm 0,34$ für die KO. Daraus resultierte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) von $1,67 \pm 0,62$ zwischen den Versuchsgruppen.

Der Vergleich im Bereich „mittig“ ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) von $1,93 \pm 0,54$ bei Mittelwerten von $8,51 \pm 0,39$ bei den WT und $10,45 \pm 0,38$ bei den KO.

Der Bereich „knochenwärts“ wies keine signifikante Differenz ($0,63 \pm 0,76$) auf. Die Mittelwerte der WT ergaben $10,65 \pm 0,63$ im Vergleich zu den KO bei $11,28 \pm 0,43$.

Innerhalb der horizontalen Ebene verhielt sich der Anteil der HA gleichmäßig, anders als Kapillaren und Muskelfibrillen. Abbildung 26 stellt das Verteilungsverhalten innerhalb der horizontalen Ebene für Kapillaren und Muskelfibrillen (mittels des Quotienten aus Kapillaren zu Muskelfibrillen) und dem Anteil von HA von Wildtypkontrollen und *Has3-knockout*-Mäusen dar.

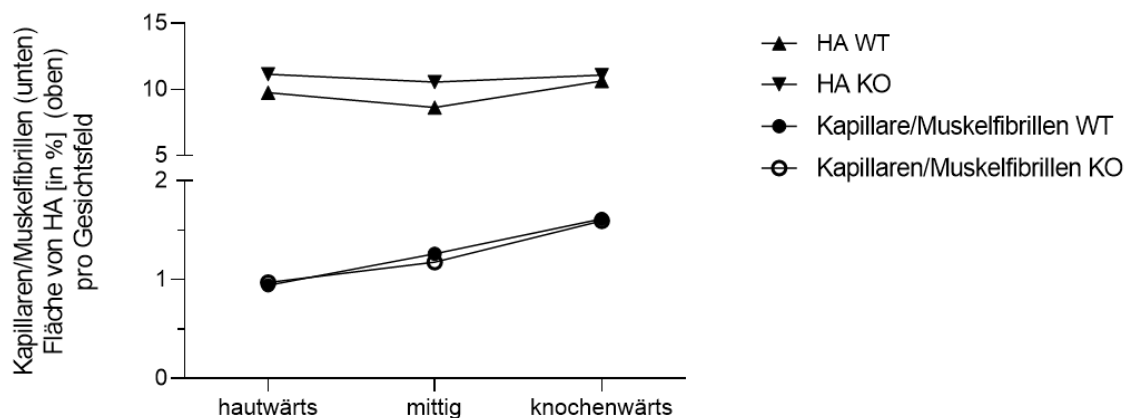


Abbildung 26: Vergleich des quantitativen Verteilungsverhaltens auf horizontaler Ebene von Kapillaren, Muskelfibrillen und HA

Dargestellt ist der Quotient von Kapillaren zu Muskelfibrillen pro Gesichtsfeld von Wildtyp- und *Has3-knockout*-Mäusen (unterer Y-Achsenanteil), sowie der prozentuale Anteil der HA (oberer Y-Achsenanteil) auf horizontaler Ebene in den Bereichen „hautwärts“, „mittig“ und „knochenwärts“ bei $n=6$.

3.3 Verteilung der Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM

Die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM konnten anhand histologischer Schnitte aus murinem Skelettmuskel mittels diverser Färbemethoden nicht nachgewiesen werden.

Eine quantitative Einordnung der HA-Bindungspartner war daher nicht möglich. Eine Stellungnahme wird in der Diskussion (4.1.2) erbracht.

Die perifibrillär vorliegenden Strukturen, die durch die CD44-Färbung akzidentiell detektiert wurden, konnten im weiteren Verlauf den Immunzellen zugeordnet werden.

3.4 RNA-Expression Hyaluronsäure-assoziierter Gene

Nachdem die HA-Quantifizierung anhand der durchgeführten Affinitätsfärbung eine breite Streuung aufwies und die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM histologisch nicht nachgewiesen werden konnten, wurde die mRNA-Expression der *Has1*, *Has2*, *Has3*, *Cd44*, *Rhamm*, sowie *Hyal1* und *Hyal2* im murinen Hinterlauf von *Has3-knockout*-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen untersucht.

Wie in Abbildung 27 dargestellt, konnte verifiziert werden, dass ein *Has3-knockout* (C) vorliegt; darüber hinaus stellte sich eine signifikante Verminderung der RNA-Expression der *Has2* (B), *Cd44* (D) und *Hyal1* (F) dar.

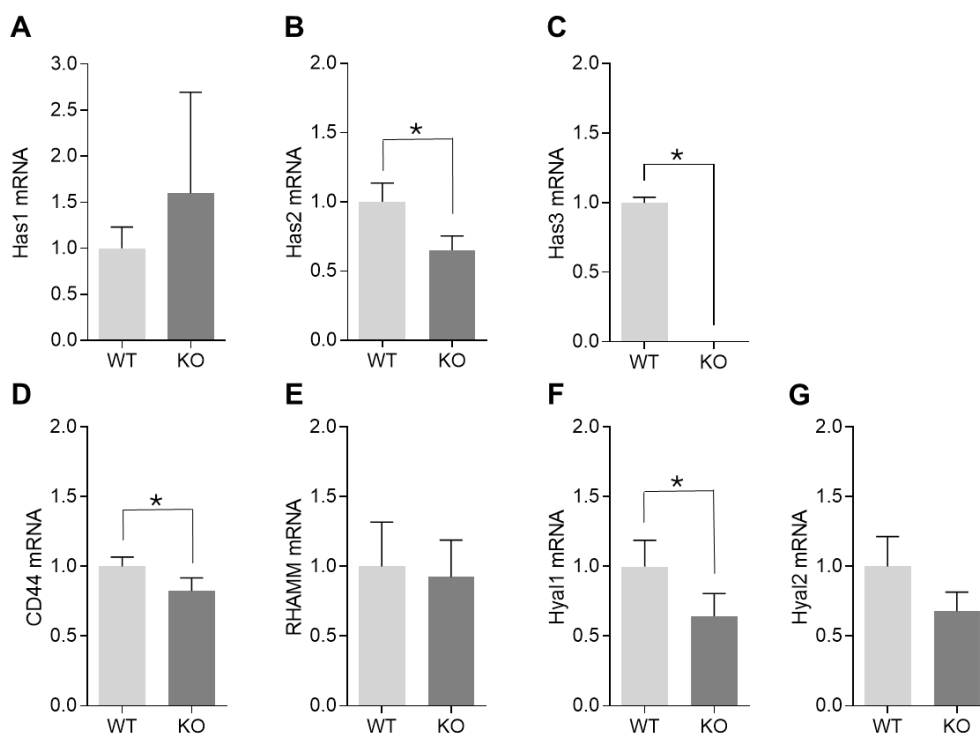


Abbildung 27: RNA-Expression Hyaluronsäure-assoziierter Gene in muriner Hinterlaufmuskulatur

Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM der RNA-Expression der *Has1* (A), *Has2* (B), *Has3* (C), *Cd44* (D), *Rhamm* (E), *Hyal1* (F) und *Hyal2* (G) von *Has3-knockout*-Mäusen gegenüber den Wildtyp-Kontrollen (Referenzwert) bei $n=3$. Eine Signifikanz (*) wurde bei $p<0,05$ (gepaarter t-Test) angenommen.

4 Diskussion

4.1 Einordnung der Ergebnisse

4.1.1 Quantität der Kapillaren und Muskelfibrillen

Mit dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass eine induzierte *Has3*-Defizienz im Mausmodel keinen Einfluss auf die Quantität der Kapillaren im Skelettmuskel unter basalen Bedingungen nimmt.

Überdies konnten keine Auswirkungen der *Has3*-Defizienz auf die Anzahl der Muskelfibrillen festgestellt werden.

In der strukturierten Analyse der Anzahl und Verteilung von Kapillaren und Muskelfibrillen wiesen sowohl die *Has3-knockout*-Mäuse als auch die Wildtyp-Kontrollen ein gleichartiges Verhalten auf. In beiden Gruppen stellte sich ein signifikanter Unterschied in der Kapillar- und Muskelfibrillenanzahl innerhalb der Querschnittsfläche des Hinterlaufmuskels dar, wie Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen. Dieser ist physiologisch und gilt insbesondere im Hinblick auf weitere Untersuchungen und die Einordnung der Ergebnisse zu berücksichtigen. Auch andere Tiermodelle zeigen die regional unterschiedliche Anordnung von Kapillaren und Muskelfibrillen in diversen Skelettmuskelpräparaten. Erklärt wird sie durch die biomechanischen Funktionen der jeweiligen Muskelfasertypen.¹⁰⁶ Die gut kapillarisierten Typ I-Muskelfasern beziehen ihre Energie überwiegend über die oxidative Energiegewinnung und finden sich vor allem bei langanhaltenden Belastungen als Bestandteil der Haltemuskulatur wieder. Die weniger kapillarisierten Muskelfasern vom Typ II (II-A und II-X) können in kurzer Zeit die volle Kraft entwickeln und sind durch überwiegend anaerobe Glykolyse charakterisiert.¹⁰⁷

Muskelfasern sind in der Lage, einen bedarfsadaptierten Typen-Shift mit einhergehender Änderung des Kapillarisierungszustandes zu durchlaufen.¹⁰⁸ Unter physiologischen Bedingungen ist der Typen-Shift multifaktoriell bedingt und abhängig von beispielsweise der körperlichen Aktivität, wird aber auch in Forschungsarbeiten unter pathophysiologischen Veränderungen, wie beispielsweise der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und der pAVK diskutiert.¹⁰⁹ Für den Tierversuch bedeutet dies, dass bei der Muskelpräparatauswahl Faktoren wie biomechanische Funktion, Aktivitäts- und

Ernährungszustand, neben Alter (degenerative Veränderungen), Geschlecht (hormonelle Schwankungen) und genetischen Eigenschaften der einzelnen Tierlinien eine entscheidende Rolle spielen.

Die in dieser Arbeit angewendete Methodik zur Quantifizierung der Kapillaren und Muskelfibrillen erwies sich als valide und durch die gute Reproduzierbarkeit als sehr reliabel.

Die Fluoreszenzfärbungen der Kapillaren mittels Anti-CD31-Antikörper zeigten sich, dank zahlreicher Erprobungen in vielen Arbeiten, als spezifisch. Auch die Abgrenzung der Kapillaren zu den Arteriolen mittels α -smooth-muscle-actin-Antikörper war präzise. Lediglich isolierte CD31-positiv-gefärbte Strukturen mit einer Querschnittsfläche kleiner als 20 μm wurden als Kapillaren eingestuft. Da jedoch auch Perizyten positiv für α -smooth-muscle-actin sind und diese die Kapillaren in gewissen Abständen umgeben, ist eine falsch-positive Einstufung als Arteriole möglich.¹¹⁰ Arbeitsgruppeninterne Voruntersuchungen zeigten jedoch, dass die Anzahl der Perizyten vernachlässigbar gering ist und deshalb hier toleriert werden konnte. Um eine präzisere Aussage zur Perizytenverteilung und zur Abgrenzung von Kapillaren zu Arteriolen zu treffen, könnten Perizyten mittels der immunhistochemischen Markierung von NG-2 oder RGS-5 additiv identifiziert werden.¹¹¹

In die Ergebnisdarstellung wurden die manuell ausgezählten Werte der Kapillaren und Muskelfibrillen bevorzugt einbezogen, da die automatische Auswertung der CD31-positiven Strukturen mittels der Software Fiji, im Vergleich zu den Werten der manuell ausgezählten Strukturen, eine größere Streuung aufwies (Abbildung 18). Von einer darüber hinaus initial angedachten Einbeziehung der Ergebnisse der prozentualen Fläche CD31 positiver Strukturen wurde abgesehen, da sich hier eine Verzerrung der Werte aufgrund unterschiedlicher Anschnittsflächen der Kapillaren zeigte. Intermittierend lagen Schnitte vor, in denen die Kapillaren nahezu zirkulär um die Muskelfibrillen herum verliefen. Der longitudinale Anschnitt führte entsprechend zu einer deutlich größeren positiv-markierten Fläche. Nachteil der sehr präzisen manuellen Auszählung ist der beträchtlich größere Zeitaufwand.

Die in einigen Veröffentlichungen genutzte Darstellung des Verhältnisses von Kapillaren zu Muskelfibrillen über die Flächenmaße der jeweiligen positiv

detektierten Strukturen, findet aufgrund der zum Teil breit gestreuten automatisch erfassten Auswertungsergebnisse in dieser Arbeit keine Anwendung. Die Vergleichbarkeit der erhobenen Daten könnte aufgrund der genannten Problematik eingeschränkt und die Genauigkeit der Ergebnisse vermindert sein. Darüber hinaus können weitere Einflussgrößen wie Hyper- oder auch Atrophie der Muskelfasern zu einer verzerrten Darstellung der Ergebnisse führen. Beispielsweise kommt es bei Tierversuchen mit Krankheitsmodell, die eine induzierte Ischämie des Hinterlaufs beinhalten, mitunter zu diesen Nebenerscheinungen. Nach der operativen Ligatur eines zuführenden Gefäßes wären akut ödematöse Veränderungen des Muskels und auch des umliegenden Gewebes zu erwarten. Die Atrophie und ein Muskelfasertypen-Shift setzen häufig erst verzögert ein und korrelieren mit der Muskelaktivität. Aufgrund der zu berücksichtigenden Faktoren von Vergleichsarbeiten wird deshalb für diese Arbeit die Darstellung mittels direkter Anzahlangaben in Form des Quotienten von Kapillaren zu Muskelfibrillen bevorzugt.

4.1.2 Nachweis der HA-Bindungspartner CD44 und RHAMM

Aufgrund der großen Bedeutung der HA-Bindungspartner an angiogenen Vorgängen sollten CD44 und RHAMM histologisch in den Skelettmuskelpräparaten untersucht werden. Es erfolgten verschiedene Versuchsreihen mittels immunhistochemischer Färbungen. In der intensiven Mikroskopie der unterschiedlich gefärbten Schnitte gelang jedoch kein Nachweis. Es wurden lediglich perifibrilläre Strukturen detektiert, die zu einer weiteren Abklärung führten. Auch die Literatur gibt an, dass die o.g. HA-Bindungspartner nicht, beziehungsweise nur minimal, im Skelettmuskel (auf Proteinebene) exprimiert werden.¹¹² Somit konnte keine Quantifizierung der HA-Bindungspartner und kein Vergleich mit den restlichen Ergebnissen erfolgen.

In der durchgeführten Expressionsanalyse der mRNA wurden *Cd44* und *Rhamm* jedoch detektiert. Es ist anzunehmen, dass die nachgewiesene mRNA Endothelzellen und/oder Immunzellen entstammt, da diese im verarbeiteten Muskelpräparat enthalten waren.

In den ausgewerteten Daten der qPCR stellte sich die mRNA von *Cd44* quantitativ vermindert in der Gruppe der KO im Vergleich zu den WT dar. Dieses konnte auch in anderen arbeitsgruppeninternen Untersuchungen gezeigt werden. Es ist

anzunehmen, dass ein vermehrtes Vorliegen von HA zu einer reaktiven Herabregulation der RNA-Expression von *Cd44* führt.¹¹³

Für Folgearbeiten wäre überdies zu diskutieren, primär Endothelzellen detaillierter auf CD44 und RHAMM bei *Has3-knockout* Mäusen und Wildtyp-Kontrollen zu untersuchen, da insbesondere durch deren Bindung an HA die Angiogenese bzw. Arteriogenese erfolgt und sie eine höhere Expression der Bindungspartner im Vergleich zu Skelettmuskelzellen aufweisen.¹¹⁴

Die bei den CD44-Färbungen zwischen den Muskelfibrillen gelegenen angefärbten Strukturen (siehe 2.4.5) stellten sich als Immunzellen heraus. Dieses wurde in weiteren arbeitsgruppeninternen Untersuchungen nachgewiesen, die Bestandteil der Dissertation von Dr. rer. nat. Rebekka Schneckmann sind.¹¹⁵

Ein quantitativer Vergleich zwischen WT und KO hinsichtlich des Vorliegens von Immunzellen wäre interessant, um weitere Einflussfaktoren auf die Angiogenese unter nicht pathophysiologisch veränderten Bedingungen beurteilen zu können. Da sich die Strukturen zumeist nur in sehr geringer Dichte zeigten und keine ausreichende Menge weiterer Schnitte der Präparate zur Verfügung standen, konnte keine Erfassung im Rahmen dieser Arbeit erfolgen.

4.1.3 Quantitative Auswertung der Hyaluronsäure-Menge

In Bezug auf das quantitative Verteilungsverhalten der HA von Wildtyp- und *Has3-knockout*-Mäusen konnte in der Gesamtübersicht kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Überdies gab es keine Korrelation zwischen dem Anteil der HA und der Anzahl der Kapillaren und Muskelfibrillen innerhalb der Querschnittfläche. Bei der detaillierten Auswertung der HA-Quantität (aus der Immunhistochemie) von *Has3-knockout*-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen stellte sich jedoch ein signifikant höheres Vorliegen von HA bei den *Has3-knockout*-Mäusen in den Bereichen „hautwärts“ und „mittig“ dar (wie Abbildung 25 zeigt). Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Gruppe der KO weniger HA aufweisen würde, insbesondere unter Berücksichtigung der mRNA-Expressionsanalyse der HA-Synthasen. In dieser zeigte sich neben dem suffizienten *Has3-knockout* auch eine signifikante Verminderung der *Has2*-Expression. Da jedoch auch die Hyaluronidasen (*Hyal1* signifikant)

quantitativ verringert exprimiert wurden, könnte das vermehrte Vorliegen von HA möglicherweise durch eine reduzierte Degradation erklärt werden. Zudem ist nicht auszuschließen, dass sich Änderungen von funktionellen Eigenschaften (entsprechend der Fragmentgröße) der synthetisierten HA durch die abweichende Expression der HA-Synthasen und Hyaluronidasen ergeben.

Um mögliche Kompensationsmechanismen, die die HA-Expression, die Aktivität der HA-Synthasen und die HA-Zusammensetzung betreffen, besser beurteilen zu können, beziehungsweise auszuschließen, könnte sich die Verwendung weiterer Versuchsreihen (*Has1*(-/-), und *Has2*(CKO)) bzw. Doppel- oder Trippel-*knockouts* anbieten.

Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass mitunter bei der automatisierten Auswertung mittels der Software *Fiji* quantitativ höhere Werte bei den KO erfasst wurden. Dieses könnte möglicherweise durch das intermittierende Vorliegen von vermehrt destruierten Zellen (aufgrund der Präparatebearbeitung) in den Schnitten und daraus resultierender unspezifischer HA-Anfärbung erklärt werden. Dementsprechend gestaltete sich im Rahmen der Analyse der HA-Quantität die Festlegung eines definierten Schwellenwertes für die Erfassung der positiv markierten Fläche schwierig. Trotz gleicher Färbebedingungen fielen mitunter größere Differenzen in der als positiv detektierten Fläche auf.

In Testfärbungen mittels fluoreszierender Antikörper gelang eine präzisere Detektion der HA. Aufgrund der Vergleichbarkeit zu bestehenden arbeitsgruppeninternen Ergebnissen fand die ursprüngliche Methodik (HA-Detektion mittels DAB) jedoch bevorzugt Anwendung.

Nach den initial vorgesehenen und den additiv durchgeführten Färbungen lagen überdies keine weiteren Schnitte der einzelnen Präparate in ausreichender Menge vor, um eine Färbereihe mit Fluoreszenzantikörper zur HA-Darstellung zu ergänzen, da mit konsekutiven Schnittfolgen gearbeitet wurde. Die alternative Färbemethode zur Quantifizierung der HA könnte zu Vergleichszwecken bzw. zur Validierung der gewonnenen Ergebnisse ergänzt werden oder in Folgearbeiten als Ersatz dienen.

Eine weitere Option der HA-Quantifizierung stellt ein zum *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) analoges Verfahren dar.¹¹⁶ Doch auch hier wäre die benötigte Vergleichbarkeit mit vorbestehenden Ergebnissen nicht gegeben, könnte jedoch für nachfolgende Arbeiten ergänzt werden. Zudem könnte eine Größenausschlusschromatographie eine quantitative Auswertung der vorliegenden

HA-Fragmentgrößen liefern, die für die Zuordnung der HA-Funktionen von relevanter Bedeutung ist.¹¹⁷

4.2 Limitationen

4.2.1 Tiermodell

Das für diese Arbeit genutzte Tiermodell der männlichen C57BL/6-Mäuse wurde ausgewählt, da die Ergebnisse dieser Arbeit den arbeitsgruppeninternen präliminären Daten als Vergleich und Referenz des basalen Status der untersuchten Strukturen dienen. Diese Mauslinie findet in Protokollen von Limbourg *et al.* häufige Anwendung, da sie, im Gegensatz zu vielen anderen Mauslinien, trotz Induktion einer ausgeprägten Ischämie des Hinterlaufs keinen Verlust dessen zur Folge hat.¹⁰² Für weitergehende Forschung resultiert daraus jedoch die Frage, welche genetischen Faktoren zu der günstigeren Ischämie-Toleranz führen. Zudem beeinflusst diese unbekannte Variable die Übertragbarkeit auf andere (Tier-) Modelle.

4.2.2 Probenumfang

Die Aussagekraft der Ergebnisse sollte bei einem geringen Probenumfang von n=6 in der histologischen Aufbereitung, bzw. n=3 in der mRNA-Expressionsanalyse gegebenenfalls durch eine Erweiterung der Probenanzahl stabilisiert werden. Die Verfügbarkeit von männlichen *Has3-knockout*-Mäusen erwies sich jedoch als schwierig. Folglich war ein Aufstocken der Probengröße im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

4.2.3 Vergleichbarkeit

Die ausgewählte Methodik orientiert sich an arbeitsgruppeninternen Vergleichsarbeiten und wurde beibehalten. Für Folgeprojekte sind alternative Methoden, insbesondere in der Evaluation der vorliegenden HA (siehe 4.1.34.1.3), zu diskutieren.

4.3 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass unter basalen, nicht pathologisch veränderten Bedingungen, keine signifikanten Veränderungen in der Kapillarisation und Anzahl der Muskelfibrillen durch einen *Has3-knockout* vorliegen. Damit diene diese Arbeit als Grundlage für weiterführende Versuche. In diesen untersuchten Dr. rer. nat. Rebekka Schneckmann und Dr. med. Tobias Driesen die Auswirkung der *Has3*-Defizienz im Model der Hinterlaufischämie im murinen Skelettmuskel.^{118, 103} Bei den *Has3-knockout*-Mäusen wiesen sie eine reduzierte Rekonstituierung des Blutflusses und eine damit einhergehende verminderte Kapillarisation des ischämischen Hinterlaufs nach. Somit stellte sich dar, dass die angiogene Wirkung der HA erst unter pathophysiologischen Vorgängen eintritt. Hinsichtlich des histologisch vermehrten HA-Nachweises und der verminderten Genexpression von *Has2*, *Cd44*, *Hyal1* bedarf es einer weiteren Abklärung, z.B. in Form einer Bestimmung der HA-Fragmentgrößen-Verteilung unter diesen Bedingungen.

Die Erforschung des Einflusses der HA nimmt hinsichtlich der Vielzahl von Erkrankungen, deren pathophysiologische Vorgänge mit ihr in Verbindung gebracht werden können, einen relevanten gesellschaftlichen Stellenwert ein. Ansätze für neuartige Therapieoptionen, die möglicherweise die Progression von Erkrankungen aufhalten können, sind nicht nur aus ökonomischer Sicht von Bedeutung, sondern können die Betroffenen vor Schmerzen und komplikationsreichen Krankheitsverläufen mit erheblichen Einschnitten in der Lebensführung und -qualität bewahren. Bezugnehmend auf die Untersuchung der murinen Hinterlaufmuskulatur stellt die pAVK aufgrund der hohen Inzidenz⁹ sowie des langwierigen Verlaufs ein greifbares Exempel für die Notwendigkeit des tiefergehenden Erkenntnisgewinns dar. Arbeitsausfälle, gesteigerter Versorgungs- und Medikamentenbedarf bei chronischen Wunden, zunehmende Grade der Behinderung durch möglichen Verlust der Extremitäten gepaart mit psychosozialen Einschränkungen stellen nur einen Teil der Auswirkungen dieser Erkrankung dar. Darüber hinaus liegt nahe, dass der Behandlungserfolg perspektivisch negativ mit der Höhe der langfristig entstehenden primären und sekundären Krankheitskosten korreliert.

Ziel der Behandlung ist es, Patienten vor fortschreitender Perfusionsstörung und ischämiebedingtem Gewebsverlust zu schützen. Über die interventionellen oder gefäßchirurgischen Grenzen hinaus könnten dazu körpereigene Mechanismen beeinflusst werden, die die Angiogenese in den minderversorgten Arealen anregen. In aktuellen Forschungen ergeben sich aus der Zielsetzung verschiedene Ansätze, die die direkte Wirkung und/oder indirekten Effekte der HA nutzen.

Dementsprechend konnte die direkte angiogene Wirkung der oHA bereits ausführlich im Rahmen der Wundheilung belegt werden. Exogen applizierte HA führte zu einer beschleunigten Gefäßeinsprossung und einem damit einhergehenden schnelleren Heilungsprozess.⁵⁵ Tang *et al.* zeigten diese Wirkung durch intramuskulär verabreichte HA in den ischämischen Hinterlauf von Mäusen. Neben den direkt auf die Angiogenese wirkenden Effekten der kurzkettigen HA, nutzten sie aber auch die stabilisierende Funktion der hochmolekularen HA. Dabei stellte sich heraus, dass EC, die in Kombination mit HA injiziert wurden, deutlich weniger der Apoptose unterlagen. Diese Versuchsreihe führte zu günstigeren Ergebnissen in der Reperfusion als die alleinige Applikation von HA oder EC.¹¹⁹ Der indirekte Effekt der HA findet auch bei der gezielten Verabreichung von gefäßwirksamen Wachstumsfaktoren oder endothelialen Stammzellen Anwendung. Da eine systemische Wirkung dabei nicht erwünscht ist, kann die Applikation gebunden in einem Biomaterial erfolgen, das zu einer gleichmäßigen Freisetzung in einem lokal umschriebenen Areal führt, wie bereits durch Ungerleider *et al.* untersucht wurde.¹²⁰ In der Zukunft wäre möglicherweise denkbar, auf diese Weise lokal begrenzt Stimulationsfaktoren zu verabreichen, um die HA-Synthasen und Hyaluronidasen direkt anzuregen, was zu einer Anreicherung von pro-angiogen wirksamer HA im betroffenen Areal führen könnte.

5 Appendix

5.1 Statistiken

Tabelle A 1: Anzahl der Todesfälle aufgrund ischämischer Erkrankungen 2020 in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2022)

Todesursachenstatistik Deutschland Gestorbene (Anzahl)

Todesursachen 2020	Geschlecht		
	männlich	weiblich	Insgesamt
Ischämische Herzkrankheiten	68599	52863	121462
Akuter oder rezidivierender Myokardinfarkt	26444	18085	44529
Zerebrovaskuläre Krankheiten	23329	29979	53308
Krankheiten der Arterien, Arteriolen und Kapillare	5996	5894	11890
Insgesamt			231189

© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2022

Tabelle A 2: Anzahl hospitalisierter Patient:innen aufgrund ischämischer Erkrankungen 2019 in Deutschland (Statistisches Bundesamt, Stand 2022)

Diagnosen der Krankenhauspatienten Deutschland, Entlassene Patienten (Anzahl)

ICD-10 (1-3-Steller) Hauptdiagnose		2019
ICD10-I20	Angina pectoris	226561
ICD10-I21	Akuter Myokardinfarkt	212396
ICD10-I22	Rezidivierender Myokardinfarkt	297
ICD10-I24	Sonstige akute ischämische Herzkrankheit	1605
ICD10-I25	Chronische ischämische Herzkrankheit	198220
ICD10-I63	Hirninfarkt	256965
ICD10-I65	Verschl.u.Stenose präzerebral.Art. ohne Hirninf.	26843
ICD10-I66	Verschl.u.Stenose zerebral.Art. ohne Hirninfarkt	739
ICD10-I70	Atherosklerose	195398
ICD10-I73	Sonstige periphere Gefäßkrankheiten	3236
ICD10-I77	Sonstige Krankheiten der Arterien und Arteriolen	6901
Insgesamt		1129161

© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2022

5.2 Herstellerverzeichnis

Tabelle A 3: Herstellerverzeichnis

Hersteller	Hauptsitz
Abcam	Cambridge, UK
Applied Biosystems	Fostercity, CA, USA
BD Pharmingen	Franklin Lakes, NJ, USA
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Engelbrecht	Edermünde, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
GraphPad Software Inc.	La Jolla, California, USA
Jackson ImmunoResearch Labs	Suffolk, UK
Klinipath	Duiven, Niederlande
Leica	Wetzlar, Deutschland
Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Linde	München, Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Microsoft	Redmond, WA, USA
Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
neoLab	Heidelberg, Deutschland
Oehmen	Essen, Deutschland
PEQLAB Biotechnologie	Erlangen, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
R. Langenbrinck	Emmendingen, Deutschland
Rotexmedica	Trittau, Deutschland
Les Laboratoires Servier	Suresnes, Frankreich
Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Sigma Prestige	St. Louis, MO, USA
Spring Bioscience	Pleasanton, CA, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Vector laboratories	San Francisco, USA
VWR	Radnor, PA, USA
VWR Chemicals	Fontenay sous Bois, Frankreich
Zeiss	Oberkochen, Deutschland

5.3 Additive Färbungen

Da sich nicht eindeutig zu klassifizierende Strukturen in den durchgeführten Färbungen zur Detektion von CD44 und RHAMM darstellten, wurden ergänzende immunhistochemische Färbungen zur Differenzierung vorgenommen.

5.3.1 CD45-Färbung

Zunächst wurde eine CD45-Färbung vorgenommen, um möglicherweise artifiziell angefärbte Leukozyten darstellen, beziehungsweise ausschließen, zu können.

Dazu wurden zum Vergleich Konsekutivschnitte der initial zu beurteilenden Regionen, nach einer Fixierung in 10 % Formalin bei 4 °C für 10 Minuten (gefolgt von dreifachem Waschen mit 1x PBS), einer Permeabilisierung mit 0,1 % Tween®20 (wie bereits unter 2.3.5 dargestellt) unterzogen und nach einstündiger Blockierung mit einem Erstantikörper gegen den Oberflächenmarker CD45 (1:200; *anti-mouse* CD45, aus dem Kaninchen) versehen. Nach dreimaligem Waschen mittels 0,1 % Tween®20 in 1x PBS wurde der Zweitantikörper (1:200; *anti-rabbit* Alexa Fluor488, aus der Ziege) aufgetragen. Nach erneutem dreifachem Waschen wurden die Schnitte mit einer Kernfärbung mittels Roti®-Mount *FluorCare* DAPI und einem Deckgläschen versehen und nach ausreichender Trocknung luftdicht versiegelt. Die Färbung erfolgte unter Lichtabschluss und die weitere Aufbewahrung bei 4 °Celsius.

5.3.2 Mac-2-Färbung

Neben der Darstellung der Leukozyten erfolgte im nächsten Schritt die Anfärbung von Makrophagen/Monozyten über die Antikörperbindung gegen das Oberflächenantigen Mac-2.

Zunächst wurden für diese Färbung weitere Konsekutivschnitte in Aceton bei 4 °C für 20 Minuten fixiert, gewaschen und blockiert. Als Erstantikörper wurde Mac-2 (1:200; *anti-mouse* Cedarlane, aus der Ratte) aufgetragen und, nach Einwirkung über Nacht, als Zweitantikörper ein polyklonaler Antikörper (1:200; *red*™-X-conjugated *anti-rat* IgG; Jackson ImmunoResearch, aus der Ziege) unter Lichtausschluss verwendet.

Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst® 33342 (1:10000); fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Schnitte mit Vectashield® eingedeckt und verschlossen.

5.3.3 Isolectin/CD45/Mac2-Dreifachfärbung

Zur weiteren Abgrenzung der unklaren Strukturen in den CD44- und RHAMM-Färbungen sollte nun eine weitere alternative Färbung erfolgen. Zu diesem Zweck

wurden weitere Konsekutivschnitte in zwei Gruppen eingeteilt, von der eine Gruppe einem Permeabilisierungsprozess unterzogen wurde.

Die Fixierung der Schnitte erfolgte in 10 % Formalin bei 4 °C für 10 Minuten. Anschließend wurde eine Gruppe einer Permeabilisierung mit 0,1 % Tween® unterzogen, die andere Gruppe unterdessen in 1x PBS verwahrt. Nach der Blockierung wurden die (Erst-)Antikörper aufgetragen. Dieses erfolgte, nachdem zunächst eine Stocklösung mit einem gelabelten Antikörper zur Detektion von Blutgefäßen (1:1000, Isolectin Alexa Fluor® 488 Conjugate; GS-IB4 From Griffonia simplicifolia, ThermoFisher) angefertigt und mit den Erstantikörpern gegen CD45 (1:300; rabbit anti-mouse; ab10058) und Mac-2 (1:300, *rat anti-mouse*; Cedarlane) versehen wurde. Bereits dieser Schritt wurde unter Lichtausschluss durchgeführt und die Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach getrenntem Waschen der zwei Gruppen mit und ohne Zusatz von 0,1 % Tween®, erfolgte die Applikation der Zweitantikörper; Mac-2 wurde mit einem konjugierten Antikörper Rhodamine RedX (*goat anti-rat*) und der Erstantikörper gegen CD45 mit AlexaFluor647 (*goat anti-rabbit*) in einer jeweiligen Verdünnung von 1:200 versehen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und getrenntem Waschen (+/- 0,1 % Tween® in 1x PBS) wurde die Kernfärbung mit Hoechst® 33342 (1:10000) durchgeführt. Nach abschließendem getrenntem Waschen erfolgte das Eindecken mit Vectashield®.

5.3.4 CD31/HA-Doppelfärbung

Zur vergleichenden Darstellung der Kapillaren/Blutgefäße und der Hyaluronsäureverteilung wurde eine alternative Doppelfärbung durchgeführt.

Die initiale Fixierung erfolgte für 20 Minuten in Aceton bei 4 °C. Nach dreifachem Waschen erfolgte ein Avidin-Biotin-Block (wie bereits detailliert unter 2.3.4 beschrieben). Nach einstündiger Blockierung (in der gängigen genannten Blockierlösung) wurde der anti-CD31-Primärantikörper (1:100; ab7388; aus der Ratte) und HABP (1:100) in 1 % BSA in PBS aufgetragen und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde der Zweitantikörper Rhodamine anti-Rat (1:100) und Streptavidin-FITC (1:200) aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Es folgte die Kernfärbung mit Hoechst® 33342 (1:10000) und das Eindecken mit Vectashield®.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ¹ Adair, Thomas H., und Jean-Pierre Montani. „Overview of Angiogenesis“. In *Angiogenesis*. Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53238/>.
- ² Gaffney, E. A., Pugh, K., Maini, P. K., & Arnold, F. (2002). Investigating a simple model of cutaneous wound healing angiogenesis. *Journal of mathematical biology*, 45(4), 337–374. <https://doi.org/10.1007/s002850200161>.
- ³ Modlich U., Kaup F.J., Augustin H.G. „Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion“. *Lab Invest.* (April 1996); 74(4):771-80. PMID: 8606487.
- ⁴ Statistisches Bundesamt (Destatis), 2022
- ⁵ Orbay, H., H. Orbay, H., Hong, H., Zhang, Y., & Cai, W. (2013). PET/SPECT imaging of hindlimb ischemia: focusing on angiogenesis and blood flow. *Angiogenesis*, 16(2), 279–287. <https://doi.org/10.1007/s10456-012-9319-4>.
- ⁶ Malyar, N., Fürstenberg, T., Wellmann, J., Meyborg, M., Lüders, F., Gebauer, K., Bunzemeier, H., Roeder, N., & Reinecke, H. (2013). Recent trends in morbidity and in-hospital outcomes of in-patients with peripheral arterial disease: a nationwide population-based analysis. *European heart journal*, 34(34), 2706–2714. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehd288>.
- ⁷ Fath, Roland. Periphere arterielle Verschlusskrankheit: Es besteht Handlungsbedarf; Dtsch Arztebl 2012; 109(5): A-205 / B-180 / C-180
- ⁸ Diehm, C., Schuster, A., Allenberg, J. R., Darius, H., Haberl, R., Lange, S., Pittrow, D., von Stritzky, B., Tepohl, G., & Trampisch, H. J. (2004). High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study. *Atherosclerosis*, 172(1), 95–105. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(03\)00204-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(03)00204-1).
- ⁹ Meijer, W. T., Hoes, A. W., Rutgers, D., Bots, M. L., Hofman, A., & Grobbee, D. E. (1998). Peripheral arterial disease in the elderly: The Rotterdam Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 18(2), 185–192. <https://doi.org/10.1161/01.atv.18.2.185>.
- ¹⁰ Deutsche Gesellschaft für Angiologie. Gesellschaft für Gefäßmedizin. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Stand: 30. September 2015
- ¹¹ Hogan, B. L., & Kolodziej, P. A. (2002). Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis. *Nature reviews. Genetics*, 3(7), 513–523. <https://doi.org/10.1038/nrg840>
- ¹² Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>
- ¹³ Carmeliet P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, 6(4), 389–395. <https://doi.org/10.1038/74651>
- ¹⁴ Distler, J. H., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., Gay, R. E., Gay, S., & Distler, O. (2003). Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *The quarterly journal of nuclear medicine : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)*, 47(3), 149–161.

-
- ¹⁵ Dimmeler, S., Haendeler, J., Rippmann, V., Nehls, M., & Zeiher, A. M. (1996). Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS letters*, 399(1-2), 71–74. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(96\)01289-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(96)01289-6)
- ¹⁶ Burri, P. H., Hlushchuk, R., & Djonov, V. (2004). Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 231(3), 474–488. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20184>
- ¹⁷ Iwaguro, H., Yamaguchi, J., Kalka, C., Murasawa, S., Masuda, H., Hayashi, S., Silver, M., Li, T., Isner, J. M., & Asahara, T. (2002). Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*, 105(6), 732–738. <https://doi.org/10.1161/hc0602.103673>
- ¹⁸ Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., & Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407(6801), 242–248. <https://doi.org/10.1038/35025215>
- ¹⁹ Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249–257. <https://doi.org/10.1038/35025220>
- ²⁰ Adair, T. H., Gay, W. J., & Montani, J. P. (1990). Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis. *The American journal of physiology*, 259(3 Pt 2), R393–R404. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.259.3.R393>
- ²¹ Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., & Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes & development*, 12(2), 149–162. <https://doi.org/10.1101/gad.12.2.149>
- ²² Ylä-Herttuala, S., Rissanen, T. T., Vajanto, I., & Hartikainen, J. (2007). Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(10), 1015–1026. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.09.053>
- ²³ Dachs, G. U., & Tozer, G. M. (2000). Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 36(13 Spec No), 1649–1660. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(00\)00159-3](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(00)00159-3)
- ²⁴ Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., & Dvorak, A. M. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American journal of pathology*, 146(5), 1029–1039.
- ²⁵ Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., & Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407(6801), 242–248. <https://doi.org/10.1038/35025215>
- ²⁶ Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, 2(3), 213–219. <https://doi.org/10.2147/vhrm.2006.2.3.213>
- ²⁷ Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J. M., & Asahara, T. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature medicine*, 5(4), 434–438. <https://doi.org/10.1038/7434>
- ²⁸ Murakami, M., & Simons, M. (2008). Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Current opinion in hematology*, 15(3), 215–220. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3282f97d98>

-
- ²⁹ Kumar, P., Shen, Q., Pivetti, C. D., Lee, E. S., Wu, M. H., & Yuan, S. Y. (2009). Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert reviews in molecular medicine*, 11, e19. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001112>
- ³⁰ Arroyo, A. G., & Iruela-Arispe, M. L. (2010). Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular research*, 86(2), 226–235. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq049>
- ³¹ Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L. E., Madan, A., Semenza, G. L., & Bedi, A. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes & development*, 14(1), 34–44.
- ³² Carmeliet P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*, 9(6), 653–660. <https://doi.org/10.1038/nm0603-653>
- ³³ Potter, R. F., & Groom, A. C. (1983). Capillary diameter and geometry in cardiac and skeletal muscle studied by means of corrosion casts. *Microvascular research*, 25(1), 68–84. [https://doi.org/10.1016/0026-2862\(83\)90044-4](https://doi.org/10.1016/0026-2862(83)90044-4)
- ³⁴ Alarcon-Martinez, L., Yemisci, M., & Dalkara, T. (2021). Pericyte morphology and function. *Histology and histopathology*, 36(6), 633–643. <https://doi.org/10.14670/HH-18-314>
- ³⁵ Armulik, A., Genové, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental cell*, 21(2), 193–215. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>
- ³⁶ Tammi, R. H., Passi, A. G., Rilla, K., Karousou, E., Vigetti, D., Makkonen, K., & Tammi, M. I. (2011). Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis. *The FEBS journal*, 278(9), 1419–1428. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08070.x>
- ³⁷ Toole B. P. (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature reviews. Cancer*, 4(7), 528–539. <https://doi.org/10.1038/nrc1391>
- ³⁸ Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, A. P., McDonald, J. A., & Kimata, K. (1999). Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *The Journal of biological chemistry*, 274(35), 25085–25092. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.25085>
- ³⁹ Weigel, P. H., & DeAngelis, P. L. (2007). Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases. *The Journal of biological chemistry*, 282(51), 36777–36781. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700036200>
- ⁴⁰ Karousou, E., Kamiryo, M., Skandalis, S. S., Ruusala, A., Asteriou, T., Passi, A., Yamashita, H., Hellman, U., Heldin, C. H., & Heldin, P. (2010). The activity of hyaluronan synthase 2 is regulated by dimerization and ubiquitination. *The Journal of biological chemistry*, 285(31), 23647–23654. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.127050>
- ⁴¹ Camenisch, T. D., & McDonald, J. A. (2000). Hyaluronan: is bigger better?. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 23(4), 431–433. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.23.4.f201>
- ⁴² Prevo, R., Banerji, S., Ferguson, D. J., Clasper, S., & Jackson, D. G. (2001). Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *The Journal of biological chemistry*, 276(22), 19420–19430. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011004200>

-
- ⁴³ Fraser, J. R., Laurent, T. C., & Laurent, U. B. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of internal medicine*, 242(1), 27–33. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x>.
- ⁴⁴ Hunnicutt, G. R., Primakoff, P., & Myles, D. G. (1996). Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biology of reproduction*, 55(1), 80–86. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.1.80>
- ⁴⁵ Stern, R., & Jedrzejewski, M. J. (2006). Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chemical reviews*, 106(3), 818–839. <https://doi.org/10.1021/cr050247k>
- ⁴⁶ Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*, 97, 4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>
- ⁴⁷ Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*, 123(Pt 24), 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>
- ⁴⁸ Laurent, T. C., & Fraser, J. R. (1992). Hyaluronan. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6(7), 2397–2404.
- ⁴⁹ Forrester, J. V., & Balazs, E. A. (1980). Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology*, 40(3), 435–446.
- ⁵⁰ Ruppert, S. M., Hawn, T. R., Arrigoni, A., Wight, T. N., & Bollyky, P. L. (2014). Tissue integrity signals communicated by high-molecular weight hyaluronan and the resolution of inflammation. *Immunologic research*, 58(2-3), 186–192. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8495-2>
- ⁵¹ Tempel, C., Gilead, A., & Neeman, M. (2000). Hyaluronic acid as an anti-angiogenic shield in the preovulatory rat follicle. *Biology of reproduction*, 63(1), 134–140. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.1.134>
- ⁵² Pardue, E. L., Ibrahim, S., & Ramamurthi, A. (2008). Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering. *Organogenesis*, 4(4), 203–214. <https://doi.org/10.4161/org.4.4.6926>
- ⁵³ Bollyky, P. L., Lord, J. D., Masewicz, S. A., Evanko, S. P., Buckner, J. H., Wight, T. N., & Nepom, G. T. (2007). Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(2), 744–747. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.744>
- ⁵⁴ Toole B. P. (1990). Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Current opinion in cell biology*, 2(5), 839–844. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(90\)90081-o](https://doi.org/10.1016/0955-0674(90)90081-o)
- ⁵⁵ Tammi, R., Pasonen-Seppänen, S., Kolehmainen, E., & Tammi, M. (2005). Hyaluronan synthase induction and hyaluronan accumulation in mouse epidermis following skin injury. *The Journal of investigative dermatology*, 124(5), 898–905. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23697.x>
- ⁵⁶ Jacobson, A., Brinck, J., Briskin, M. J., Spicer, A. P., & Heldin, P. (2000). Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *The Biochemical journal*, 348 Pt 1(Pt 1), 29–35.
- ⁵⁷ Slevin, M., Kumar, S., & Gaffney, J. (2002). Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *The Journal of biological chemistry*, 277(43), 41046–41059. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109443200>

-
- ⁵⁸ Eberlein, M., Scheibner, K. A., Black, K. E., Collins, S. L., Chan-Li, Y., Powell, J. D., & Horton, M. R. (2008). Anti-oxidant inhibition of hyaluronan fragment-induced inflammatory gene expression. *Journal of inflammation (London, England)*, 5, 20. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-5-20>
- ⁵⁹ Petrey, A. C., & de la Motte, C. A. (2014). Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Frontiers in immunology*, 5, 101. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00101>
- ⁶⁰ Jiang, D., Liang, J., & Noble, P. W. (2007). Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annual review of cell and developmental biology*, 23, 435–461. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337>
- ⁶¹ McKee, C. M., Penno, M. B., Cowman, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Bao, C., & Noble, P. W. (1996). Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *The Journal of clinical investigation*, 98(10), 2403–2413. <https://doi.org/10.1172/JCI119054>
- ⁶² Horton, M. R., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Bao, C., & Noble, P. W. (1998). Regulation of hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN-gamma in mouse macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(6), 3023–3030.
- ⁶³ Noble P. W. (2002). Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 21(1), 25–29. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(01\)00184-6](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(01)00184-6)
- ⁶⁴ Lees, V. C., Fan, T. P., & West, D. C. (1995). Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 73(2), 259–266.
- ⁶⁵ Itano, N., Sawai, T., Miyaishi, O., & Kimata, K. (1999). Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer research*, 59(10), 2499–2504.
- ⁶⁶ Sussmann, M., Sarbia, M., Meyer-Kirchrath, J., Nüsing, R. M., Schrör, K., & Fischer, J. W. (2004). Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. *Circulation research*, 94(5), 592–600. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000119169.87429.A0>
- ⁶⁷ Kosaki, R., Watanabe, K., & Yamaguchi, Y. (1999). Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. *Cancer research*, 59(5), 1141–1145.
- ⁶⁸ Camenisch, T. D., Spicer, A. P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M. L., Calabro, A., Jr, Kubalak, S., Klewer, S. E., & McDonald, J. A. (2000). Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *The Journal of clinical investigation*, 106(3), 349–360. <https://doi.org/10.1172/JCI10272>
- ⁶⁹ Underhill C. (1992). CD44: the hyaluronan receptor. *Journal of cell science*, 103 (Pt 2), 293–298. <https://doi.org/10.1242/jcs.103.2.293>
- ⁷⁰ Ponta, H., Sherman, L., & Herrlich, P. A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(1), 33–45. <https://doi.org/10.1038/nrm1004>
- ⁷¹ Sleeman, J. P., Kondo, K., Moll, J., Ponta, H., & Herrlich, P. (1997). Variant exons v6 and v7 together expand the repertoire of glycosaminoglycans bound by CD44. *The Journal of biological chemistry*, 272(50), 31837–31844. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31837>

-
- ⁷² Afify, A., Purnell, P., & Nguyen, L. (2009). Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Experimental and molecular pathology*, 86(2), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.003>
- ⁷³ Bourguignon, L. Y., Zhu, D., & Zhu, H. (1998). CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 3, d637–d649. <https://doi.org/10.2741/a308>
- ⁷⁴ Knudson, W., Chow, G., & Knudson, C. B. (2002). CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 21(1), 15–23. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(01\)00186-x](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(01)00186-x)
- ⁷⁵ Oliferenko, S., Kaverina, I., Small, J. V., & Huber, L. A. (2000). Hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia outgrowth. *The Journal of cell biology*, 148(6), 1159–1164. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.6.1159>
- ⁷⁶ Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Shao, L., & Chen, Y. W. (2000). CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *The Journal of biological chemistry*, 275(3), 1829–1838. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.1829>
- ⁷⁷ Tong, L., & Tergaonkar, V. (2014). Rho protein GTPases and their interactions with NFκB: crossroads of inflammation and matrix biology. *Bioscience reports*, 34(3), e00115. <https://doi.org/10.1042/BSR20140021>
- ⁷⁸ Bourguignon L. Y. (2008). Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Seminars in cancer biology*, 18(4), 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.007>
- ⁷⁹ Singleton, P. A., Dudek, S. M., Ma, S. F., & Garcia, J. G. (2006). Transactivation of sphingosine 1-phosphate receptors is essential for vascular barrier regulation. Novel role for hyaluronan and CD44 receptor family. *The Journal of biological chemistry*, 281(45), 34381–34393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603680200>
- ⁸⁰ Jensen, P. V., & Larsson, L. I. (2004). Actin microdomains on endothelial cells: association with CD44, ERM proteins, and signaling molecules during quiescence and wound healing. *Histochemistry and cell biology*, 121(5), 361–369. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0648-2>
- ⁸¹ Bellacosa, A., Kumar, C. C., Di Cristofano, A., & Testa, J. R. (2005). Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Advances in cancer research*, 94, 29–86. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(05\)94002-5](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(05)94002-5)
- ⁸² Karar, J., & Maity, A. (2011). PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience*, 4, 51. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00051>
- ⁸³ Yu, Q., & Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & development*, 14(2), 163–176.
- ⁸⁴ Taylor, K. R., Yamasaki, K., Radek, K. A., Nardo, A. D., Goodarzi, H., Golenbock, D., Beutler, B., & Gallo, R. L. (2007). Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *The Journal of biological chemistry*, 282(25), 18265–18275. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606352200>

-
- ⁸⁵ Li, L., Heldin, C. H., & Heldin, P. (2006). Inhibition of platelet-derived growth factor-BB-induced receptor activation and fibroblast migration by hyaluronan activation of CD44. *The Journal of biological chemistry*, 281(36), 26512–26519. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605607200>
- ⁸⁶ Turley E. A. (1992). Hyaluronan and cell locomotion. *Cancer metastasis reviews*, 11(1), 21–30. <https://doi.org/10.1007/BF00047600>
- ⁸⁷ Yang, B., Zhang, L., & Turley, E. A. (1993). Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM. *The Journal of biological chemistry*, 268(12), 8617–8623.
- ⁸⁸ Liu, S., Calderwood, D. A., & Ginsberg, M. H. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *Journal of cell science*, 113 (Pt 20), 3563–3571. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.20.3563>
- ⁸⁹ Turley, E. A., Noble, P. W., & Bourguignon, L. Y. (2002). Signaling properties of hyaluronan receptors. *The Journal of biological chemistry*, 277(7), 4589–4592. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100038200>
- ⁹⁰ Hall, C. L., et al. (1996). "pp60(c-src) is required for cell locomotion regulated by the hyaluronanreceptor RHAMM." *Oncogene* 13(10): 2213-2224.
- ⁹¹ Lokeshwar, V. B., & Selzer, M. G. (2000). Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 275(36), 27641–27649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003084200>
- ⁹² Hall, C. L., Wang, C., Lange, L. A., & Turley, E. A. (1994). Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *The Journal of cell biology*, 126(2), 575–588. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.2.575>
- ⁹³ Senger D. R. (1996). Molecular framework for angiogenesis: a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines. *The American journal of pathology*, 149(1), 1–7.
- ⁹⁴ Savani, R. C., Cao, G., Pooler, P. M., Zaman, A., Zhou, Z., & DeLisser, H. M. (2001). Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 276(39), 36770–36778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102273200>
- ⁹⁵ Wang, Y. Z., Cao, M. L., Liu, Y. W., He, Y. Q., Yang, C. X., & Gao, F. (2011). CD44 mediates oligosaccharides of hyaluronan-induced proliferation, tube formation and signal transduction in endothelial cells. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 236(1), 84–90. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010206>
- ⁹⁶ Evanko, S. P., Johnson, P. Y., Braun, K. R., Underhill, C. B., Dudhia, J., & Wight, T. N. (2001). Platelet-derived growth factor stimulates the formation of versican-hyaluronan aggregates and pericellular matrix expansion in arterial smooth muscle cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 394(1), 29–38. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2507>
- ⁹⁷ Nagy, N., Freudenberger, T., Melchior-Becker, A., Röck, K., Ter Braak, M., Jastrow, H., Kinzig, M., Lucke, S., Suvorava, T., Kojda, G., Weber, A. A., Sörgel, F., Levkau, B., Ergün, S., & Fischer, J. W. (2010). Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis. *Circulation*, 122(22), 2313–2322. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.972653>

-
- ⁹⁸ Röck, K., Grandoch, M., Majora, M., Krutmann, J., & Fischer, J. W. (2011). Collagen fragments inhibit hyaluronan synthesis in skin fibroblasts in response to ultraviolet B (UVB): new insights into mechanisms of matrix remodeling. *The Journal of biological chemistry*, 286(20), 18268–18276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.201665>
- ⁹⁹ Hall, B., Limaye, A., & Kulkarni, A. B. (2009). Overview: generation of gene knockout mice. *Current protocols in cell biology*, Chapter 19, Unit–19.12.17. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1912s44>
- ¹⁰⁰ Siiskonen, H., Oikari, S., Pasonen-Seppänen, S., & Rilla, K. (2015). Hyaluronan synthase 1: a mysterious enzyme with unexpected functions. *Frontiers in immunology*, 6, 43. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00043>
- ¹⁰¹ Matsumoto, K., Li, Y., Jakuba, C., Sugiyama, Y., Sayo, T., Okuno, M., Dealy, C. N., Toole, B. P., Takeda, J., Yamaguchi, Y., & Koshier, R. A. (2009). Conditional inactivation of Has2 reveals a crucial role for hyaluronan in skeletal growth, patterning, chondrocyte maturation and joint formation in the developing limb. *Development (Cambridge, England)*, 136(16), 2825–2835. <https://doi.org/10.1242/dev.038505>
- ¹⁰² Limbourg, A., Korff, T., Napp, L. C., Schaper, W., Drexler, H., & Limbourg, F. P. (2009). Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nature protocols*, 4(12), 1737–1746. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.185>
- ¹⁰³ Driesen, T., Schuler, D., Schmetter, R., Heiss, C., Kelm, M., Fischer, J. W., & Freudenberger, T. (2016). A systematic approach to assess locoregional differences in angiogenesis. *Histochemistry and cell biology*, 145(2), 213–225. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1379-2>
- ¹⁰⁴ Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682 (2012). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- ¹⁰⁵ Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- ¹⁰⁶ Torrella, J. R., Whitmore, J. M., Casas, M., Fouces, V., & Viscor, G. (2000). Capillarity, fibre types and fibre morphometry in different sampling sites across and along the tibialis anterior muscle of the rat. *Cells, tissues, organs*, 167(2-3), 153–162. <https://doi.org/10.1159/000016778>
- ¹⁰⁷ Wilson, J. M., Loenneke, J. P., Jo, E., Wilson, G. J., Zourdos, M. C., & Kim, J. S. (2012). The effects of endurance, strength, and power training on muscle fiber type shifting. *Journal of strength and conditioning research*, 26(6), 1724–1729. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e318234eb6f>
- ¹⁰⁸ Romanul, F. C. (1964). "Distribution of Capillaries in Relation to Oxidative Metabolism of Skeletal Muscle Fibres." *Nature* 201: 307-308. <https://doi.org/10.1038/201307a0>
- ¹⁰⁹ Kim, H. C., Mofarrahi, M., & Hussain, S. N. (2008). Skeletal muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 3(4), 637–658. <https://doi.org/10.2147/copd.s4480>
- ¹¹⁰ Alarcon-Martinez, L., Yilmaz-Ozcan, S., Yemisci, M., Schallek, J., Kılıç, K., Can, A., Di Polo, A., & Dalkara, T. (2018). Capillary pericytes express α -smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *eLife*, 7, e34861. <https://doi.org/10.7554/eLife.34861>

-
- ¹¹¹ Armulik, A., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circulation research*, 97(6), 512–523. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7>
- ¹¹² Human Protein Atlas [proteinatlas.org](https://www.proteinatlas.org)
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000026508-CD44/tissue/skeletal+muscle>
- ¹¹³ Twarock, S., Freudenberger, T., Poscher, E., Dai, G., Jannasch, K., Dullin, C., Alves, F., Prenzel, K., Knoefel, W. T., Stoecklein, N. H., Savani, R. C., Homey, B., & Fischer, J. W. (2011). Inhibition of oesophageal squamous cell carcinoma progression by in vivo targeting of hyaluronan synthesis. *Molecular cancer*, 10, 30. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-30>
- ¹¹⁴ Park, D., Kim, Y., Kim, H., Kim, K., Lee, Y. S., Choe, J., Hahn, J. H., Lee, H., Jeon, J., Choi, C., Kim, Y. M., & Jeoung, D. (2012). Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGF β receptor interaction via CD44-PKC δ . *Molecules and cells*, 33(6), 563–574. <https://doi.org/10.1007/s10059-012-2294-1>
- ¹¹⁵ Schneckmann, Rebekka. Bedeutung der Hyaluronsäuresynthase 3 für die Angiogenese und Arteriogenese. urn:nbn:de:hbz:061-20181112-092715-3
- ¹¹⁶ Cowman, M. K., Lee, H. G., Schwertfeger, K. L., McCarthy, J. B., & Turley, E. A. (2015). The Content and Size of Hyaluronan in Biological Fluids and Tissues. *Frontiers in immunology*, 6, 261. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00261>
- ¹¹⁷ Shanmuga Doss, S., Bhatt, N. P., & Jayaraman, G. (2017). Improving the accuracy of hyaluronic acid molecular weight estimation by conventional size exclusion chromatography. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1060, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.006>
- ¹¹⁸ Schneckmann, R., Suvorava, T., Hundhausen, C., Schuler, D., Lorenz, C., Freudenberger, T., Kelm, M., Fischer, J. W., Flögel, U., & Grandoch, M. (2021). Endothelial Hyaluronan Synthase 3 Augments Postischemic Arteriogenesis Through CD44/eNOS Signaling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 41(10), 2551–2562. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.315478>
- ¹¹⁹ Tang, Z. C., Liao, W. Y., Tang, A. C., Tsai, S. J., & Hsieh, P. C. (2011). The enhancement of endothelial cell therapy for angiogenesis in hindlimb ischemia using hyaluronan. *Biomaterials*, 32(1), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.085>
- ¹²⁰ Ungerleider, J. L., & Christman, K. L. (2014). Concise review: injectable biomaterials for the treatment of myocardial infarction and peripheral artery disease: translational challenges and progress. *Stem cells translational medicine*, 3(9), 1090–1099. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0049>
- ¹²¹ Twarock, S., Tammi, M. I., Savani, R. C., & Fischer, J. W. (2010). Hyaluronan stabilizes focal adhesions, filopodia, and the proliferative phenotype in esophageal squamous carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(30), 23276–23284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.093146>
- ¹²² Valentin, B., Arsov, C., Ullrich, T., Al-Monajjed, R., Boschheidgen, M., Hadaschik, B. A., Giganti, F., Giessing, M., Lopez-Cotarelo, C., Esposito, I., Antoch, G., Albers, P., Radtke, J. P., & Schimmöller, L. (2023). Magnetic Resonance Imaging-guided Active Surveillance Without Annual Rebiopsy in Patients with Grade Group 1 or 2 Prostate Cancer: The Prospective PROMM-AS Study. *European urology open science*, 59, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.euros.2023.10.005>

¹²³ Selig, J. I., Boulgaropoulos, J., Niazy, N., Ouwers, D. M., Preuß, K., Horn, P., Westenfeld, R., Lichtenberg, A., Akhyari, P., & Barth, M. (2021). Crosstalk of Diabetic Conditions with Static Versus Dynamic Flow Environment-Impact on Aortic Valve Remodeling. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6976. <https://doi.org/10.3390/ijms22136976>

¹²⁴ Kremer, Noah & Kremer, Lenn. (2024) Comparative analysis of strength and endurance in skeletal muscle of two adorable juvenile mice.

Danksagung

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock¹²¹ für die Übernahme und Begleitung meiner Dissertation sowie PD Dr. med. Alexandra Lijmani als Zweitgutachterin. Darüber hinaus möchte ich mich ganz besonders bei Dr. med. Birte Valentin¹²² für die Hilfestellungen, das Motivieren und das endlose Lesen dieser Arbeit bedanken.

Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die sehr angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre im Institut, vor allem Dr. rer. nat. Rebekka Schneckmann und Annika Zimmermann, die sicherlich zum Gelingen dieser Arbeit in großem Maße beigetragen haben. Auch Dr. rer. nat. Jessica Selig¹²³ bin ich sehr dankbar für die kreativen Pausen und die vor allem emotionale Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken – das Begleiten war nicht immer einfach – aber es hat sich gelohnt.