

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

**Untersuchung der Zellkomposition im Herzen von *Hmmr*-
überexprimierenden Mäusen nach kardialer Ischämie
und Reperfusion**

Dissertation

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

vorgelegt von
Luisa Maria Anna Peterburs
2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Zusammenfassung

Hyaluronsäure (HA), ein Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM), hat durch eine frühe Akkumulation nach akutem Myokardinfarkt (MI) einen großen Einfluss auf die kardiale Heilung und das *Remodeling*. Die Signaltransduktion der HA findet vor allem mithilfe der beiden Hauptrezeptoren CD44 und dem *Receptor of hyaluronan-mediated motility*, auch bekannt als *Hyaluronan-mediated motility receptor* (RHAMM / HMMR), statt.

Die vorliegende Arbeit ermittelt die Rolle des RHAMM-Rezeptors nach MI. Hierzu wurden Mäuse mit einer genetischen RHAMM-Überexpression (*Hmmr-OE*) und entsprechende Wildtyp (WT) Kontrollen in einem Modell der kardialen Ischämie und Reperfusion (I/R) bei geschlossenem Thorax untersucht. Die *Hmmr-OE* Mäuse wiesen eine signifikant geringere Narbengröße im Vergleich zu den WT-Mäusen auf, was auf einen positiven Einfluss der *Hmmr-OE* auf kardiale Heilungsprozesse schließen lässt. Zur weiteren Analyse wurde die Zellkomposition mittels Immunhistochemie 1 Woche und 72 Stunden nach I/R analysiert. Hinsichtlich der untersuchten Immunzellen, Fibroblasten und Endothelzellen zeigte sich 1 Woche nach I/R kein Unterschied zwischen den *Hmmr-OE* und WT-Mäusen. 72 Stunden nach I/R war die Anzahl der CD68⁺ Makrophagen bei den *Hmmr-OE* Mäusen signifikant geringer. Dieses Ergebnis kann bisher jedoch noch nicht durch weitere Untersuchungen oder Daten erklärt werden. Die Analyse der Proliferation 1 Woche nach I/R zeigte, dass die Zahl der proliferierenden Zellen in *Hmmr-OE* Mäusen signifikant geringer war als in WT-Mäusen war. Dies deutet auf eine allgemein geringere Aktivierung der Zellen bei *Hmmr-OE* hin, möglicherweise auf Grund einer primär geringeren kardialen Schädigung. Zur vollständigen Erklärung des protektiven Phänotyps der *Hmmr-OE* Mäuse sollten daher weitere beteiligte Zelltypen und Zeitpunkte nach I/R untersucht werden.

Summary

Hyaluronic acid (HA), as an integral part of the extracellular matrix (ECM), has a great impact on cardiac healing and the remodeling due to early accumulation post myocardial infarction (MI). The signal transduction of HA takes place primarily with the help of the two main receptors CD44 and the receptor of hyaluronan-mediated motility, also known as the hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM / HMMR).

The present study aims to investigate the role of the RHAMM-receptor post MI. For this purpose, mice with a genetic RHAMM-overexpression (*Hmmer*-OE) and a control group of wild type (WT) mice were examined in a closed-chest ischemia and reperfusion (I/R) model.

The *Hmmer*-OE mice had a significantly smaller scar size compared to the WT mice, which suggests a positive influence of *Hmmer*-OE on cardiac healing processes. For further analysis, cell composition was analyzed using immunohistochemistry 1 week and 72 hours post I/R. With regard to the examined immune cells, fibroblasts and endothelial cells, 1 week after I/R there was no difference between the *Hmmer*-OE and WT mice. 72 hours after I/R, the number of CD68⁺ macrophages was significantly lower in the *Hmmer*-OE mice. However, this result cannot yet be explained by further studies or data. Analysis of proliferation 1 week after I/R showed that the number of proliferating cells was significantly lower in *Hmmer*-OE mice than in WT mice. This suggests a generally lower activation of the cells in *Hmmer*-OE, possibly due to primarily less cardiac damage. To fully explain the protective phenotype of the *Hmmer*-OE mice, further cell types and time points post I/R should be investigated.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Acta2	<i>Actin Alpha 2, Smooth Muscle Actin</i>
AF	Alexa Fluor
AK	Antikörper
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
cTnI	Kardiales Troponin I
cTnT	Kardiales Troponin T
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetales bovines Serum
FN-EDA	Fibronektin Extradomäne A
g	Gramm
GlcA	D-Glukuronsäure
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	Hyaluronsäure
HARE	<i>Hyaluronan receptor for endocytosis</i>
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HMGB1	<i>High-mobility-group-box 1</i>

HMMR	<i>Hyaluronan-mediated motility receptor</i>
HYAL	Hyaluronidase
I/R	Ischämie und Reperfusion
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KO	<i>Knockout</i>
LAD	<i>Left anterior descending</i>
LV	Linker Ventrikel
LYVE1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1</i>
MertK	<i>Myeloid-epithelial-reproductive receptor tyrosine kinase</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility</i>
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
nm	Nanometer
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
OE	<i>Overexpressing</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Postn	Periostin
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
RHAMM	<i>Receptor of hyaluronan-mediated motility</i>
Rn18S	18S ribosomale RNA
ROI	<i>Region of Interest</i>

ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPM	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SEM	Standardfehler
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
UDP	Uridindiphosphat
WGA	Weizenkeim-Agglutinin
WT	Wildtyp
α-SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Todesursachen in Deutschland.....	1
1.1.1	Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	2
1.2	Myokardinfarkt.....	3
1.2.1	Pathophysiologie.....	3
1.3	Hyaluronsäure.....	12
1.3.1	Struktur.....	12
1.3.2	Synthese.....	13
1.3.3	Abbau.....	13
1.3.4	Rezeptoren und Bindeproteine.....	14
1.4	Hyaluronsäure und Myokardinfarkt.....	16
1.4.1	RHAMM und Myokardinfarkt.....	17
1.5	Ziele der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Tierversuche.....	19
2.1.1	Genehmigung.....	19
2.1.2	Mäuse.....	19
2.1.3	Durchführung der Ischämie und Reperfusion.....	21
2.2	Präparation der Herzen.....	22
2.3	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer realtime-PCR.....	23
2.3.1	RNA-Extraktion.....	23
2.3.2	cDNA-Synthese.....	23
2.3.3	Quantitative realtime-PCR.....	24
2.4	Histologische Analyse.....	25
2.4.1	Allgemeiner Ablauf.....	25
2.4.2	Mesenchymzell-Färbung.....	26
2.4.3	Makrophagen-Färbung.....	26
2.4.4	Fibroblasten-Färbung.....	26
2.4.5	Proliferations-Färbung.....	27
2.4.6	Endothelzell-Färbung.....	27
2.4.7	Quantifizierung.....	28

2.5	Statistische Analyse.....	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	<i>Hmmr</i> -Expression 1 Woche nach Ischämie und Reperfusion.....	31
3.2	Einfluss von RHAMM auf postischämische Inflammation	32
3.2.1	Reaktion der Mesenchymzellen	32
3.2.2	Immunantwort der Makrophagen.....	34
3.2.3	Antwort der Fibroblasten.....	36
3.2.4	Reaktion der Endothelzellen.....	40
3.3	Einfluss von RHAMM auf postischämische Zellproliferation	41
3.3.1	Lokale Proliferation 1 Woche nach Ischämie und Reperfusion.....	41
3.3.2	Lokale Proliferation 72 Stunden nach Ischämie und Reperfusion	43
4	Diskussion	44
4.1	Einfluss der <i>Hmmr</i> OE auf die kardiale Heilung post I/R.....	45
4.2	Einfluss der <i>Hmmr</i> OE auf die Zellantwort post I/R.....	45
4.2.1	<i>Hmmr</i> OE und Mesenchymzellen.....	46
4.2.2	<i>Hmmr</i> OE und Fibroblasten	46
4.2.3	<i>Hmmr</i> OE und Endothelzellen	47
4.2.4	<i>Hmmr</i> OE und Makrophagen.....	47
4.3	Einfluss der <i>Hmmr</i> OE auf die Zellproliferation post I/R.....	49
4.4	Ausblick und Limitierung.....	50
5	Literaturverzeichnis.....	51

1 Einleitung

1.1 Todesursachen in Deutschland

Laut dem Statistischen Bundesamt verstarben im Jahr 2020 in Deutschland insgesamt 985.572 Menschen. Mit einem Anteil von 34,3 % waren Erkrankungen des Herzkreislauf-Systems die häufigste Todesursache. An erster Stelle mit 75.482 Todesfällen steht die chronische ischämische Herzkrankheit. Diese wird dicht gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (AMI) mit insgesamt 44.529 Todesfällen und der Herzinsuffizienz mit 34.855 Todesfällen. Aufgeteilt in weibliches und männliches Geschlecht zeigt sich folgende Verteilung nach ICD-Klassifikation der fünf häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 2020 (Abb.1) [1]. Die Herzkreislauf-Erkrankungen waren im Jahr 2020 nicht nur in Deutschland, sondern auch weltweit auf Platz eins der häufigsten Todesursachen [2].

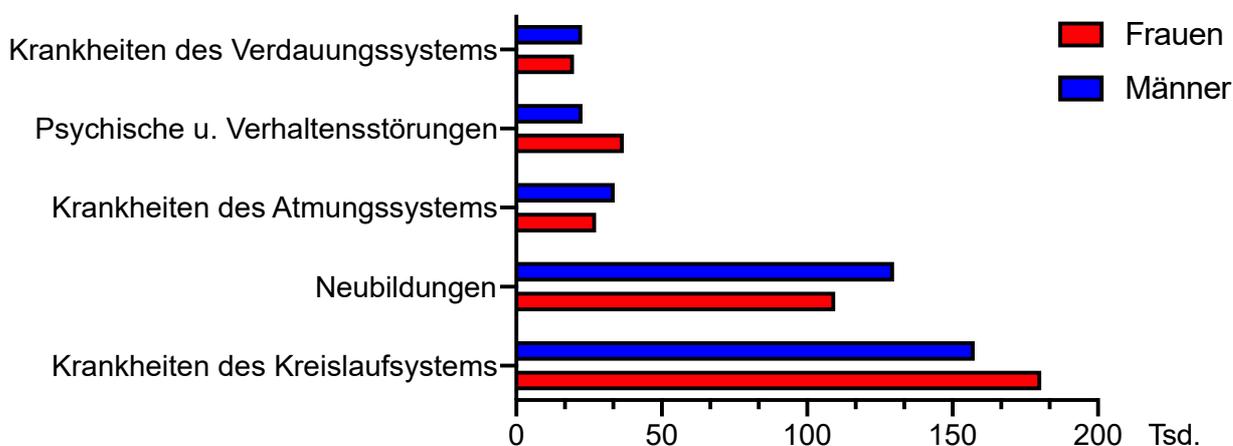


Abbildung 1: Verteilung der fünf häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 2020 nach ICD-Klassifikation. [1] In Rot sind alle weiblichen Todesfälle dargestellt, in Blau sind alle männlichen Todesfälle dargestellt. Tsd.= Tausend.

1.1.1 Herzkreislauf-Erkrankungen

Für Erkrankungen des Herzkreislaufsystems, wie der koronaren Herzerkrankung, dem Myokardinfarkt (MI) und der Herzinsuffizienz, sind zahlreiche Risikofaktoren bekannt. Individuelle Risikofaktoren wie erhöhter Blutdruck, ein erhöhter Cholesterinspiegel, Diabetes mellitus, Adipositas und Rauchen begünstigen die Entstehung einer Herzkreislauf-Erkrankung [3],[4]. Diese Risikofaktoren fördern zudem die Entwicklung von Arteriosklerose [5], welche häufig ursächlich für ischämische Herzerkrankungen ist. Durch das Vorhandensein von obstruktiven arteriosklerotischen Plaques in den Koronargefäßen wird der Blutfluss und somit die Sauerstoffversorgung des Myokards reduziert [6]. Eine länger andauernde Unterversorgung des Herzgewebes mit Sauerstoff führt zum irreversiblen Zelltod der betroffenen Zellen [7]. Kardiomyozyten im reifen Herzen sind teilweise gar nicht oder nur sehr eingeschränkt zur Regeneration fähig [8], [9]. Deshalb können die Schädigung des Herzgewebes und damit verbundene Umbauvorgänge langfristig zur Herzinsuffizienz und Herzversagen führen [10].

Aus diesen Gründen und der Tatsache, dass Herzkreislauf-Erkrankungen weiterhin die häufigste Todesursache in Deutschland und weltweit sind, ergibt sich die Dringlichkeit der Weiterentwicklung der Postinfarkt-Versorgung. Zudem zeigten Studien, dass die Rate der nicht-tödlichen ischämischen Herzerkrankungen stärker zunahm als tödlich verlaufende ischämische Herzerkrankungen [11]. Patienten mit myokardialen Schaden haben zudem eine schlechte Langzeitprognose und ein erhöhtes Mortalitätsrisiko [12]. Es ist daher besonders wichtig, nicht nur die Akuttherapie des MI weiter zu erforschen, sondern insbesondere Therapien für die langfristige Versorgung von MI-Patienten und Patientinnen weiter zu entwickeln. Hierzu bedarf es jedoch noch einiger Grundlagenforschung, da die zugrundeliegende Pathophysiologie der Postinfarktphase bis heute nicht vollständig verstanden ist.

1.2 Myokardinfarkt

Für die Diagnose eines akuten MI muss eine klinische Evidenz einer myokardialen Nekrose, einhergehend mit myokardialer Ischämie, vorliegen [13]. Die genaue Definition des akuten MI beinhaltet zwingend eine erhöhte Troponin-Konzentration im Blut (> 99. Perzentile) mit zusätzlich einem weiteren Kriterium. Dieses Kriterium können Symptome einer myokardialen Ischämie, neu aufgetretene ischämische Veränderungen im Elektrokardiogramm (EKG), ein in der Bildgebung festgestellter Verlust vitalen Myokards oder die Identifikation eines koronaren Thrombus in der Angiographie sein [14]. Das kardiale Troponin ist ein Proteinkomplex, bestehend aus drei Subtypen (C, T und I), der die Herzkontraktion reguliert [15]. Im Zuge des Untergangs der Kardiomyozyten in Folge der Ischämie kommt es zu einer Freisetzung des Troponins [16]. Insbesondere das kardiale Troponin T (cTnT) und Troponin I (cTnI) werden ausschließlich in Kardiomyozyten exprimiert [17], [18]. Daher haben die erhöhten cTnT- und cTnI-Serumkonzentrationen sowie die Dauer der Konzentrationserhöhung eine hohe Sensitivität in der Diagnostik des AMI [19]. Darüber hinaus korreliert die Serumkonzentration der beiden Troponin-Subtypen mit der Größe des Infarkts und der postischämischen kardialen Funktion [20],[21].

1.2.1 Pathophysiologie

Der AMI wird klinisch hinsichtlich seiner Pathophysiologie und Prognose sowie den daraus folgenden Therapiestrategien in fünf unterschiedliche Typen eingeteilt [14]. Der Typ 1 MI wird durch einen Defekt der koronaren Gefäße verursacht. Die häufigste Ursache ist die Erosion oder Ruptur eines atherosklerotischen Plaques in den Koronararterien [22]. Der Typ 2 des AMI entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen myokardialer Sauerstoffnachfrage und Sauerstoffangebot ohne die Ruptur eines atherothrombotischen Plaques [23]. Dies kann entweder durch einen erhöhten Sauerstoffbedarf des Myokards oder eine erniedrigte Sauerstoffversorgung, beispielweise durch eine koronare endotheliale Dysfunktion, verursacht werden [14]. Typ 3 des MI ist der plötzliche kardiale Herztod, bei welchem der Nachweis einer Troponin-Erhöhung oder von EKG-Veränderungen nicht mehr erfolgen kann. Die Typen 4 und 5 sind iatrogen herbeigeführte Formen des MI. Ein MI der im Zuge einer perkutanen Koronarintervention ausgelöst wird, wird als Typ 4a klassifiziert und ein MI bedingt durch eine Stent-Thrombose als 4b.

Der Typ 5 MI tritt während oder 48 Stunden (h) nach einer kardialen Operation auf [14], [12], [24].

1.2.1.1 Untergang der Kardiomyozyten

Verschiedene Faktoren tragen zu dem schnellen Kardiomyozyten-Untergang nach Infarkt bei. Schon 30 bis 40 Minuten nach Unterbrechung des Blutflusses können erste nekrotische Zellen nachgewiesen werden. Ab diesem Zeitpunkt sterben die weiteren Kardiomyozyten exponentiell [25]. Die Kardiomyozyten der subendokardialen Zone sterben meist zuerst, da diese Zone einen höheren Energiebedarf hat und dadurch am stärksten von der Ischämie betroffen ist. Von dort aus breitet sich der Schaden bis zur epikardialen Zone weiter aus [26], [27]. Myokardiale Ischämie entsteht, wenn der arterielle Blutfluss den Sauerstoffbedarf des myokardialen Gewebes nicht ausreichend decken kann. Durch die Ischämie kommt es zu mehreren komplexen metabolischen Veränderungen, die hauptsächlich durch zwei Effekte verursacht werden. Auf der einen Seite kommt es durch das verminderte Sauerstoffangebot zu einer Hypoxie. Auf der anderen Seite kommt es zur Erschöpfung der Energieversorgung und im Herzgewebe zu einer Akkumulation der Stoffe, die beim ischämischen Metabolismus entstehen. Wenige Sekunden nach Unterbrechung der Sauerstoffversorgung wird die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien reduziert und es folgt die Erschöpfung des mitochondrialen Adenosintriphosphat (ATP) -Vorrats [26]. Die effektiven Kontraktionen des Herzmuskels nehmen stark ab und es kommt bereits zu EKG-Veränderungen [28]. Einige Sekunden später erfolgt der Wechsel von aerober zu anaerober Glykolyse. Die initiale anaerobe Glykolyse kann nur ca. ein Viertel der aeroben Glykolyserate erreichen [29]. Bei der anaeroben Glykolyse entstehende Zwischenprodukte, insbesondere Laktat, akkumulieren im ischämischen Myokard. Durch das Fehlen von Sauerstoff können diese nicht weiter metabolisiert werden. Auf Grund der sehr niedrigen sarkoplasmatischen ATP-Konzentration kommt es im weiteren Verlauf zum vollständigen Stillstand der Glykolyse [29]. Durch die Freisetzung von Molekülen, die als Gefahrensignale fungieren, sogenannte gefahrenassoziierte molekulare Muster (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs), stellen nekrotische Kardiomyozyten den Hauptstimulus zur Inflamationsreaktion dar. Auch verletzte Zellen und geschädigte extrazelluläre Matrix (EZM) setzen neben reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*,

ROS), DAMPs frei [30], [31]. Diese DAMPs werden durch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) auf Immunzellen erkannt. Daraufhin lösen sie eine inflammatorische Kaskade mit der Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen aus [32], [33]. Es sind mehrere DAMPs im Herzen nach MI bekannt. Dazu gehören das von nekrotischen Zellen freigesetzte DNA-Stabilisator-Protein *High-mobility-group-box 1* (HMGB1) und Hitzeschockproteine sowie die EZM-Moleküle Fibronectin Extradomäne A (FN-EDA) [34] und Hyaluronsäure (HA) [35]. Die wichtigsten PRRs sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLR). TLRs sind Transmembranproteine, welche hauptsächlich von Leukozyten, aber auch von Kardiomyozyten, Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert werden [32], [30]. Durch verschiedene Signalwege können die TLRs zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB führen und so die Transkription proinflammatorischer Gene steigern. Dies führt dann zu einer vermehrten Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen [30], [36].

1.2.1.2 Inflammatorische Phase

Der Untergang der Kardiomyozyten initiiert die Inflammation durch Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und Monozyten [25]. Die inflammatorische Phase findet in den ersten 3 bis 4 Tagen nach MI statt [37]. In diesen Tagen kommt es zur Infiltration verschiedener Immunzellen. Die frühe inflammatorische Reaktion ist essentiell für darauffolgende reparative und proliferative Vorgänge [30]. Klinisch kann die Inflammation durch erhöhte Entzündungsparameter, wie dem C-reaktiven Protein (CRP) und Interleukin (IL)-6, festgestellt werden [38], [39].

1.2.1.2.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Immunzellen, die das Infarktgebiet erreichen. Sie initiieren die Entzündungsreaktion sowie die Gewebedestruktion [40]. Durch die Interaktion zwischen CXC-Chemokinen und dem von neutrophilen Granulozyten exprimierten CXCR2-Chemokinrezeptor werden die Zellen in die Infarktzone gelockt [31], [30]. Der Prozess der Extravasation führt daraufhin zum Verlassen der Blutzirkulation und zur Infiltration in das ischämische Gebiet. Hierzu interagieren die Immunzellen mit Endothelzellen über P- und L-Selektin, welche an

intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (*intercellular adhesion molecules*, ICAMs) und vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen binden. Die Bindung von β -Integrinen an weitere ICAMs führt zu einer stärkeren Adhäsion an die Endothelzellen. Die postischämische Freisetzung der DAMPs von nekrotischen Kardiomyozyten aktiviert die Endothelzellen und führt zu einer vermehrten Expression der Adhäsionsmoleküle [41]. Die endgültige Migration findet dann durch para- oder intrazellulären Transport statt [42]. Durch die Freisetzung von ROS, Zytokinen und Chemokinen sowie Phagozytose fördern die neutrophilen Granulozyten auf der einen Seite die Inflamationsreaktion, führen auf der anderen Seite jedoch auch zur Gewebsschädigung [40]. Darüber hinaus bilden neutrophile Granulozyten sogenannte neutrophile extrazelluläre Fallen (*neutrophil extracellular traps*, NETs). Diese bestehen aus Chromatin, Histonen und Granula mit proteolytischen Enzymen und helfen dabei Pathogene aufzunehmen oder direkt zu zerstören [43], [37]. Es konnte gezeigt werden, dass die Intensität der NET Formationen mit der Größe des Infarkts korreliert [44]. Zudem können Vernetzungen der NETs mit Plasmafibrinogen zur Bildung von Thromben führen [45]. Bei Mäusen und Kaninchen konnte gesehen werden, dass einige Tage nach dem MI die Infiltration der neutrophilen Granulozyten endet, da ein Großteil dieser in Apoptose geht [46]. Durch die Freisetzung von Annexin A1 und Lactoferrin verhindern die apoptotischen neutrophilen Granulozyten weitere Infiltration [47]. Zudem führt die Aufnahme der apoptotischen neutrophilen Granulozyten von Makrophagen zur Freisetzung von antiinflammatorischen Mediatoren, wie IL-10 und dem transformierenden Wachstumsfaktor (*transforming growth factor*, TGF) [48]. Obwohl in einem Hunde-Modell gezeigt wurde, dass die Depletion von neutrophilen Granulozyten zu einer verminderten Infarktgröße führt [49], konnte in einer anderen murinen Studie festgestellt werden, dass die Depletion zu einer signifikanten Verschlechterung der Herzfunktion nach MI führt. Zudem beeinflusste die Depletion der neutrophilen Granulozyten die Expression des Phagozytose-Rezeptors *myeloid-epithelial-reproductive receptor tyrosine kinase* (MertK) auf Makrophagen. Dies führte zu einer verminderten Beseitigung von apoptotischen Zellen und verbleibendem Zelldebris [50].

1.2.1.2.2 Monozyten und Makrophagen

Als weiterer Bestandteil des angeborenen Immunsystems wandern Monozyten und Makrophagen in den ersten Tagen nach MI in das ischämische Areal ein [51]. Hierzu kommt es vor allem durch die Infiltration von Monozyten aus der Blutbahn, welche dann im Infarktgebiet zu Makrophagen differenzieren. Ein Teil der Monozyten stammt direkt aus der Blutbahn, ein weiterer Teil wird über den Angiotensin-Typ1a-Rezeptor aus der Milz mobilisiert. Dieser dimerisiert bei Interaktion mit dem Hormon Angiotensin II, welches nach MI vermehrt freigesetzt wird. Die Dimerisierung des Rezeptors bewirkt eine Veränderung des Zytoskeletts und vereinfacht so die Migration der Zellen [52]. Experimente mit Splenektomien zeigten, dass bis zu 50 % der Monozyten, welche in das Infarktgebiet einwandern, aus der Milz stammen [53]. In Studien konnte festgestellt werden, dass eine große Anzahl undifferenzierter Monozyten in der roten Pulpa der Milz gespeichert werden und bei Verletzung eines Gewebes schnell in die Blutbahn abgegeben werden können [54]. Neben den einwandernden Zellen gibt es auch residente Makrophagen im Myokard, welche ca. 8 % aller Nicht-Kardiomyozyten im Herzen ausmachen. Diese Population ist jedoch bereits kurz nach der myokardialen Ischämie stark dezimiert [55], [56]. Obwohl die residenten Makrophagen des Myokards in den ersten Wochen nach MI nur 2-5 % aller Makrophagen in der Infarktzone ausmachen, führt ihre Depletion zu einer beeinträchtigten kardialen Funktion und Heilung des Infarktgebiets [55].

Bei Menschen und auch bei Mäusen, konnten zwei Monozyten-Subpopulationen beschrieben werden. Diese werden beim Menschen anhand der Expression von CD14 (*cluster of differentiation*) und CD16 klassifiziert. Klassische Monozyten, welche ca. 90 % aller Monozyten ausmachen, werden als CD14⁺CD16^{low} beim Menschen, und als Ly-Cc^{high} bei der Maus, beschrieben. Die Migration dieser Monozyten erfolgt über die Interaktion von Chemokinen mit dem auf der Oberfläche der Monozyten exprimierten CC-Chemokin-Rezeptor2 [57]. Die klassischen Monozyten produzieren inflammatorische Zytokine sowie Myeloperoxidasen und Matrixmetalloproteasen zur Verdauung von infarziertem nekrotischen Gewebe [58]. Die nicht-klassischen Monozyten werden beim Menschen als CD14⁺CD16^{high} und bei der Maus als Ly-C^{low} beschrieben. Diese Monozyten-Population wird über den Chemokin-Rezeptor CX3CR1 rekrutiert [53]. Die Funktion dieser Zellen ist weniger bekannt. Sie befinden sich nah am Endothel und es wird davon ausgegangen, dass sie eine wichtige Rolle in der immunologischen Überwachung spielen, indem sie

nekrotische Zellen und Pathogene phagozytieren [59], [60]. Beide Monozyten-Gruppen sind zudem in der Lage sich in Makrophagen und dendritische Zellen zu differenzieren [61], [37]. Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen geht mit einer Zunahme der Expression von CD68 und MHCII (*major histocompatibility 2*) einher [61].

Makrophagen erfüllen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen. Bis vor einiger Zeit wurden sie demnach in die zwei Subtypen M1 und M2 unterteilt [61]. Die zwei Makrophagen-Subtypen können jedoch nicht vollständig voneinander differenziert werden. Neueste Untersuchungen weisen auf eine heterogene Population von funktionell verschiedenen Makrophagen im murinen Herzen hin [62]. Es wird davon ausgegangen, dass es ein Netzwerk von Makrophagen gibt, welches abhängig von Umgebungsreizen aktiviert wird und so einen Übergang der Makrophagen von einem pro- zu einem antiinflammatorischen Phänotypen bewirkt [56]. Nach MI stimulieren proinflammatorische Signale die Makrophagen, sodass diese zwischen Tag 3 und 5 post MI ihre größte Anzahl erreichen. Sie produzieren ROS, proinflammatorische Zytokine wie IL-12, IL-23, Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und Matrixmetalloproteasen. Außerdem präsentieren sie Antigene über MHCII an T-Helferzellen [61], [63]. Funktionell antiinflammatorische Makrophagen werden hingegen durch antiinflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-13 aktiviert und sind an Tag 7 nach MI am stärksten vertreten [64], [65]. Diese Makrophagen produzieren antiinflammatorische Zytokine und Chemokine sowie Wachstumsfaktoren. Diese Signale führen zu einer Stimulation von Fibroblasten und somit zur Zellproliferation, Produktion von extrazellulärer Matrix und Angiogenese [61].

Zudem kann davon ausgegangen werden, dass Makrophagen eine wichtige Rolle in der Regeneration des Organs spielen. Neonatale Mäuser Herzen können normalerweise im Gegensatz zu adulten Herzen ohne Narbenbildung nach MI abheilen. In Experimenten der Arbeitsgruppe Aurora *et al.* wurden in einem neonatalen Maus-Modell Monozyten und Makrophagen durch Chlodronat-Liposomen depletiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch fehlende Vaskularisierung und Gewebereparatur nach MI die Wundheilung dieser Tiere gestört war [66]. Dennoch konnte in einer Patienten-Studie aus dem Jahr 2002 gezeigt werden, dass eine erhöhte Zahl an Monozyten nach MI mit kardialen Pumpversagen und linksventrikulären Aneurysmen in Verbindung steht. Dies deutet

auf eine Beteiligung der Monozyten am linksventrikulären *Remodeling* nach MI hin [67].

1.2.1.2.3 Lymphozyten

Die wichtigsten Bestandteile der erworbenen Immunität sind T- und B-Zellen. Sie entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark. Im Gegensatz zur angeborenen Immunität reagiert das erworbene Immunsystem langsamer. Es ist jedoch hoch Antigen-spezifisch [68]. T-Zellen werden vom angeborenen Immunsystem durch die Antigenpräsentation auf MHC I- und MHC II-Molekülen aktiviert. Diese Antigen-präsentierenden Zellen sind Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen. Nach Interaktion der Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptoren mit dem MHC-Komplex schütten die T-Zellen IL-2 aus, welches das Wachstum und die Differenzierung der Zellen initiiert [69]. Daraufhin verlassen die differenzierten T-Zellen den Lymphknoten und migrieren in das inflammatorische Gebiet. CD4⁺ T-Zellen werden abhängig von ihrem Zytokin-Profil als Th1, Th2, Th17 und regulatorische T-Zellen klassifiziert [70]. Durch Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine beeinflussen CD4⁺ T-Zellen indirekt die Immunantwort. Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen lysieren hingegen Zielzellen direkt [71]. Regulatorische T-Zellen sorgen vor Allem für die Regeneration des geschädigten Gewebes durch Unterdrückung der Immunantwort, Initiierung der Revaskularisierung und Beeinflussung der Makrophagen-Differenzierung hin zu einer antiinflammatorischen Funktion [72]. Studien konnten zeigen, dass insbesondere die CD4⁺ T-Zellen eine bedeutende Rolle nach MI einnehmen. Experimente an Mäusen aus dem Jahr 2006 zeigten, dass CD4⁺ T-Zell depletierte und CD8⁺ T-Zell nicht depletierte Mäuse eine signifikant kleinere Infarktgröße aufwiesen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen. Außerdem konnte festgestellt werden, dass das von CD4⁺ T-Zellen ausgeschüttete Zytokin Interferon-gamma (IFN- γ) Teil einer bedeutenden Inflammationskaskade ist. Die Deletion des Zytokins von CD4⁺ T-Zellen reduzierte die Infarktgröße und führte zu einer verminderten T-Zell- und Neutrophilen-Akkumulation 24 h nach Infarkt [73]. Dies deutet daraufhin, dass CD4⁺ T-Zellen und deren Ausschüttung von IFN- γ maßgeblich zur myokardialen Schädigung nach postischämischer Reperfusion beitragen.

Über die Rolle der B-Zellen im Hinblick auf MI ist hingegen bisher wenig bekannt. Allerdings konnte festgestellt werden, dass die Depletion von B-Zellen bei Mäusen

nach MI zu einem kleineren Infarkt sowie einer erhöhten linksventrikulären Kontraktilität führte [74].

1.2.1.3 Reparative Phase

Die inflammatorische Phase geht einige Tage nach MI in die reparative Phase über. In dieser Phase stehen die Wundheilung und Narbenbildung im Vordergrund. Dies soll eine myokardiale Ruptur sowie die funktionale Verschlechterung des Herzmuskels verhindern [37].

1.2.1.3.1 Fibroblasten

Fibroblasten stellen die zweitgrößte Population residenter Zellen im Myokard dar [75]. Die Aktivierung der Fibroblasten durch DAMPs führt zu einer vermehrten Proliferation, Migration ins Infarktgebiet und Produktion von fibrotischen sowie inflammatorischen Faktoren [76]. Neben weiteren Faktoren wurde der TGF- β 1 als wichtigster Stimulator zur Differenzierung von Fibroblasten zu aktivierten Myofibroblasten identifiziert [77], [78]. Dieser fördert die Produktion von EZM-Molekülen und Protease-Inhibitoren. TGF- β 1 wird neben Fibroblasten auch von Makrophagen produziert und freigesetzt [79], [31]. Die Proliferation der residenten Fibroblasten erreicht ihren Höhepunkt 3 bis 4 Tage nach Ischämie, wohingegen die Proliferation der aktivierten Myofibroblasten in der Infarktregion weitere 2 bis 3 Tage anhält [80]. Die Myofibroblasten zeichnen sich insbesondere in den ersten Tagen durch die Expression von glattem-Muskel- α -Aktin (α -smooth muscle actin, α -SMA), einem kontraktilen Protein, aus. In den Tagen 7 bis 10 nach Infarkt nehmen sowohl die Proliferation als auch die Expression des α -SMA der differenzierten Myofibroblasten stark ab. Bis zu diesem Zeitpunkt modulieren die Myofibroblasten den Umbau der EZM und tragen somit zur Bildung des Narbengewebes bei. Hierzu produzieren sie große Mengen an Strukturproteinen wie Kollagen und Fibronectin sowie Matrixmetalloproteasen und deren Inhibitoren [81], [75]. Die differenzierten Myofibroblasten bleiben trotz des Verlusts des α -SMA im Narbengewebe erhalten. Bei Mäusen wurden noch weiter differenzierte Myofibroblasten gefunden, welche als Matrifibrozyten bezeichnet werden. Diese sind maßgeblich an der langfristigen Aufrechterhaltung des Narbengewebes beteiligt (s. Abb. 2). Es ist davon auszugehen, dass dieser Zelltyp auch beim Menschen vorliegt [80]. Somit tragen

die kardialen Fibroblasten zur Wundheilung, zum *Remodeling* und zur langfristigen Narbenbildung bei. Ein weiterer Marker der aktivierten Myofibroblasten ist Periostin (*Postn*). Dieses Protein ist an der zellulären Adhäsion und Organisation von Kollagen beteiligt und wird nach MI verstärkt im infarzierten Gebiet exprimiert [82], [83]. Zudem fördert es die Motilität und Kontraktilität der Zellen sowie die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Fibroblasten. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *Postn* zu einer signifikant erhöhten Mortalität, auf Grund von kardialer Ruptur, führt [83]. Dies deutet daraufhin, dass Periostin essentiell für die Funktion der Fibroblasten und die Narbenbildung ist.

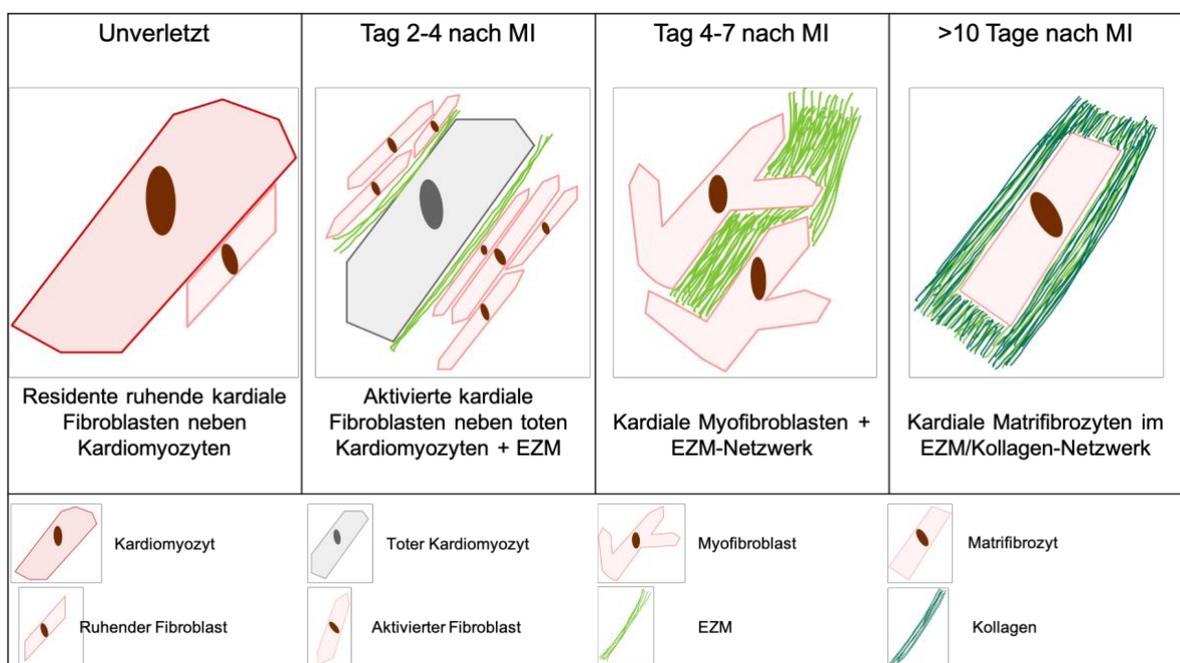


Abbildung 2: Modell der Stadien der kardialen Fibroblasten nach MI. Im unverletzten kardialen Gewebe befinden sich ruhende Fibroblasten. 2-4 Tage nach MI werden diese aktiviert und differenzieren 4-7 Tage nach MI zu Myofibroblasten. Nach über 10 Tagen differenzieren sie dann zu Matrifibrozyten. (Modifiziert nach [80])

1.3 Hyaluronsäure

1.3.1 Struktur

Hyaluronsäure (HA), ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM), ist ein Glykosaminoglykan bestehend aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten. Diese Einheiten bestehen aus D-Glukuronsäure (GlcA) und N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc), welche über β -1,3- bzw. β -1,4-glykosidische Bindungen verbunden sind (s. Abb. 3). Es liegt als unverzweigtes lineares Polysaccharid vor und zeichnet sich durch ein hohes Molekulargewicht von bis zu 10 Megadalton aus [84], [85]. HA existiert in allen Geweben des menschlichen Körpers. Die höchsten Konzentrationen finden sich beim gesunden Menschen in der Nabelschnur, der Synovialflüssigkeit, dem Glaskörper des Auges und der Haut. Die geringste Konzentration kann im Serum nachgewiesen werden [86], [87]. Im Gegensatz zu anderen Glykosaminoglykanen ist HA nicht sulfatiert oder anderweitig modifiziert [86].

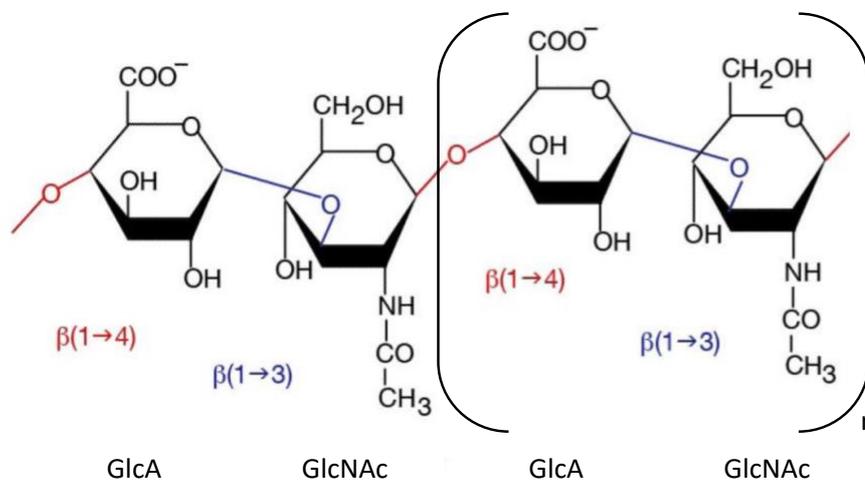


Abbildung 3: Chemische Struktur der Hyaluronsäure. (modifiziert nach [88])

Hoch- und niedermolekulare HA übernehmen verschiedene Funktionen im Organismus. So befinden sich große HA-Polymere hauptsächlich im Extrazellulärraum und fungieren dort als Füllmaterial und Strukturprotein [89]. In dieser Funktion ist die Eigenschaft der HA viele Wassermoleküle binden zu können besonders wichtig [90]. Niedermolekulare HA hingegen ist vermehrt an pathologischen Prozessen, wie beispielsweise an der chronisch entzündlichen

Darmerkrankung, beteiligt und übernimmt inflammatorische sowie immunmodulatorische Funktionen [91], [92].

1.3.2 Synthese

Die Synthese der HA erfolgt an der inneren Plasmamembran der jeweiligen Zelle durch die Hyaluronsäuresynthasen (*Has*). Diese werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und erst nach dem Transport an die Plasmamembran aktiviert. Uridindiphosphat (UDP)- α -D-Glukuronsäure und UDP- α -N-Acetyl-D-Glukosamin dienen den *Has* als zytosolische Substrate. Diese werden abwechselnd an das reduzierte Ende der Polysaccharid-Kette unter Abspaltung eines UDPs angehängt. Das fertige Polysaccharid wird dann durch die Plasmamembran in den Extrazellulärraum abgegeben [85]. Es gibt drei verschiedene Isoenzyme der *Has*, die an der HA-Synthese beteiligt sind: *Has1*, *Has2* und *Has3*. Die drei Isoenzyme weisen ähnliche Aminosäuresequenzen sowie molekulare Strukturcharakteristika auf [93]. Die Expression der *Has*-Enzyme ist der entscheidendste Faktor für die HA-Syntheserate des jeweiligen Zelltyps. Zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren können die *Has*-Expression beeinflussen. Es ist allerdings vom jeweiligen Zelltyp abhängig welche Stimuli die *Has*-Expression fördern und welche nicht. Die größte Menge der HA-Synthese wird der *Has2* zugeschrieben [94], [95]. Zudem konnte in einem Mausmodell festgestellt werden, dass die *Has2* auch während der initialen Organogenese die Hauptquelle für HA ist. So kam es in einer Untersuchung zum vorzeitigen Versterben der *Has2*-defizienten Mäuse an Tag 9,5 auf Grund starker Abweichungen der Entwicklung des kardiovaskulären Systems. Diese Fehlentwicklung sowie die verringerte Lebensdauer konnten bei *Has1*-, *Has3*- und *Has1-/Has3*-defizienten Mäusen nicht beobachtet werden [84].

1.3.3 Abbau

Der Abbau der HA erfolgt über Hyaluronidasen (HYAL), welche die β -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen N-Acetyl-Glukosamin und der Glukuronsäure hydrolysieren. Im Menschen wurden sechs verschiedenen HYALs identifiziert: HYALs1-4, PH-20 und HYALP1. HYAL1 und HYAL2 übernehmen den größten Teil des Katabolismus in somatischen Geweben [86], [89]. Es wird davon ausgegangen, dass hochmolekulare HA an der Zelloberfläche zunächst von der HYAL2 gespalten

wird. Die dabei entstehenden ca. 20 Kilodalton großen Fragmente werden daraufhin intrazellulär in Endosomen und Lysosomen weiter von der HYAL1 verdaut. Beide Enzyme weisen ein pH-Optimum im sauren Bereich auf [89, 96]. Für die kardiale Funktion scheint insbesondere die HYAL2 eine essentielle Rolle zu spielen. So konnte 2013 gezeigt werden, dass es bei *HYAL2-Knockout* (KO) Mäusen zu einer Akkumulation von HA im Serum und Herzmuskel kam. Dies führte unter anderem zu einer desorganisierten EZM-Struktur und einer signifikanten Verdickung der Herzklappen. Der verminderte HA-Abbau verursachte so eine schwere kardiale Dysfunktion und das vorzeitige Versterben der Tiere [97]. Ein weiteres Protein das für den Abbau der HA zuständig ist das *cell migration inducing protein* (CEMIP), auch bekannt als HYBID (*hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization*). Diese Hyaluronidase ist bislang insbesondere im Zusammenhang mit Tumorgenese und Osteoarthritis erforscht [98], [99].

1.3.4 Rezeptoren und Bindeproteine

Der Hauptrezeptor für HA ist das Transmembranprotein CD44. Dieses wird in nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Inflammation, Tumorwachstum und Metastasierung [100], [101]. Die Bindung von HA erfolgt über das Linkmodul von CD44. Dies führt zu einer Konformationsänderung des zytoplasmatischen Teils, der dann mit regulatorischen Molekülen interagiert. Obwohl CD44 durch ein einzelnes Gen kodiert ist, kann es durch alternatives Splicing und post-translationale Modulationen bis zu 20 Isoformen annehmen. Diese Isoformen erfüllen verschiedene Funktionen und erlauben so eine differenzierte Regulation [100], [102]. Weitere HA-Bindeproteine mit Linkmodul sind HARE (*hyaluronan receptor for endocytosis*) und LYVE1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*) [103], [104]. Die Hyalactane, eine Gruppe der Proteoglykane, sind extrazelluläre HA-Bindeproteine. Zu dieser Gruppe gehören *Aggrecan*, *Brevican*, *Versican* und *Neurocan*, welche überwiegend im Gehirn exprimiert werden [105].

1.3.4.1 RHAMM-Rezeptor

Der RHAMM-Rezeptor (*Receptor of hyaluronan-mediated motility*) stellt neben CD44 einen der beiden wichtigsten Rezeptoren für HA dar und wird auch als CD168 oder HMMR (*Hyaluronan-mediated motility receptor*) bezeichnet. Das *Hmnr*-Gen enthält 18 Exons und unterliegt wie CD44 dem alternativen Splicing. Somit liegen verschiedene *Hmnr*-Isoformen vor [106], [107], [108]. Die bekanntesten Isoformen sind *Hmnr* A-D und werden vor allem in Tumorzellen gefunden [109]. RHAMM kann sich sowohl auf der Zelloberfläche, als auch im Zytoplasma und im Nukleus der Zelle befinden [110]. Anders als CD44 besitzt RHAMM kein Linkmodul für HA. Die HA-RHAMM Interaktion findet über die BX7B-Domäne des Rezeptors statt. An der Zelloberfläche interagiert der Rezeptor mit Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) und Nicht-RTK, wie CD44, PDGFR und dem TGF β 1-Rezeptor, und reguliert so die Zellmotilität [111]. Intrazellulär kann RHAMM durch die Bindung an Aktinfilamente und Mikrotubuli des Zytoskeletts sowie der Interaktion mit der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) und *Src*-Kinasen die Zellmigration beeinflussen [112]. Diese Funktionen spielen insbesondere in der Tumورprogression und Metastasierung eine wichtige Rolle. Es konnte nachgewiesen werden, dass RHAMM in vielen Tumorzellen, aber auch in Zellen geschädigter Gewebe überexprimiert vorliegt. In einer Studie mit Mäusen mit einer Bleomycin-induzierten Lungenerkrankung konnte gezeigt werden, dass RHAMM eine wichtige Komponente der Inflammationskaskade und der Fibrose nach Gewebsschädigung darstellt. Die RHAMM-Inhibition hingegen führte zu einer verminderten pulmonalen Akkumulation von Makrophagen. Das deutet auf eine Beteiligung von RHAMM an der Regulation der Motilität und Proliferation der Makrophagen hin [113]. In gesunden Geweben hingegen wird RHAMM nur gering exprimiert [109], [114].

CD44 und RHAMM können unabhängig voneinander mit HA interagieren und verschiedene Funktionen ausführen. In einigen Fällen wurden jedoch auch gleiche und sich überschneidende Funktionen der beiden Rezeptoren festgestellt. Es konnte nachgewiesen werden, dass in einem Arthritis-Modell die Erkrankung bei den WT Mäusen CD44-abhängig ist. In CD44-KO Mäusen war die Erkrankung hingegen RHAMM-abhängig. Die RHAMM-abhängigen Signalwege proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 und TNF- α , wurden in Abwesenheit von CD44 aktiviert und führten zu einer verstärkten inflammatorischen Reaktion [115].

1.4 Hyaluronsäure und Myokardinfarkt

Die EZM ist nicht nur als mechanische Unterstützung des Herzens nach MI wichtig, sondern auch als Regulator der Inflammationsreaktion. So modulieren die Moleküle der EZM den Phänotypen und die Funktion der Fibroblasten, Leukozyten und Endothelzellen [31]. Insbesondere HA scheint eine wichtige Rolle in der Postinfarktphase zu spielen. So konnte von Petz *et al.* gezeigt werden, dass im murinen Herzen die HA-Synthese sowie Anreicherung im Myokard nach Ischämie und Reperfusion (I/R) erhöht ist. Die Inhibition der HA-Anreicherung durch eine *Has2*-Deletion verstärkte die hämodynamische Dysfunktion und Narbenbildung. Außerdem konnte in den *Has2*-KO Mäusen eine reduzierte Anzahl der kardialen Makrophagen und Myofibroblasten nachgewiesen werden. Dies wird zum einen auf eine erhöhte Apoptoserate der Makrophagen sowie auf eine verminderte Differenzierung und Proliferation der aktivierten Fibroblasten zurückgeführt [116]. Neben *Has2* ist auch *Has3* relevant für das postischämische *Outcome* bei Mäusen. Bei *Has3*-KO Mäusen wurde nach I/R eine reduzierte Ejektionsfraktion (EF), also eine eingeschränkte kardiale Funktion, festgestellt. Im Unterschied zu den *Has2*-KO Mäusen konnte bei den *Has3*-KO Mäusen keine Änderung der Makrophagen-Population gefunden werden, jedoch eine signifikante Abnahme der CD4⁺ T-Zellen 7 Tage nach I/R [117]. Diese murinen Studien zeigen den deutlichen Einfluss der HA auf die Immunreaktion, sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunität, nach MI. In einem Mausmodell nach I/R aus dem Jahr 2008 konnte zudem gezeigt werden, dass der HA-Rezeptor CD44 eine wichtige Rolle im postischämischen *Remodeling* spielt. Die CD44-Expression im infarzierten Myokard war deutlich erhöht, insbesondere auf der Zelloberfläche der Leukozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Zudem führte ein Mangel an CD44 zu einer verstärkten Inflammationsreaktion [118].

Auch die exogene Zugabe von HA wurde im Rahmen des MI untersucht. Bei Schweinen führte die Zugabe eines HA-haltigen Hydrogels kurz nach dem MI zu einer verminderten linksventrikulären Dilatation und verbesserte so die kardiale Funktion [119]. Weitere Studien an Ratten zeigten neben einer kardialen Funktionsverbesserung auch eine vermehrte Neovaskularisation im Infarktgebiet nach Applikation eines HA-haltigen Hydrogels [120]. Dies deutet daraufhin, dass die therapeutische Applikation von HA nach MI eine Therapieoption darstellen könnte.

1.4.1 RHAMM und Myokardinfarkt

Neben CD44 spielt auch der HA-Rezeptor RHAMM eine wichtige Rolle in der Postinfarktphase. In einer Studie mit Zebrafischen kam es nach der Schädigung des Myokards zu einer erhöhten *Hmnr*-Expression im gesamten Herzen, wohingegen die *Hmnr*-Expression in naiven Herzen nicht nachweisbar war. Der Anstieg der Expression konnte 3 Tage nach der Gewebsschädigung festgestellt werden und nahm nach 7 Tagen wieder ab. Außerdem wurde gezeigt, dass bei *Hmnr*-defizienten Zebrafischen die Narbengröße signifikant erhöht und die Angiogenese reduziert waren. Zudem konnte auch bei Ratten eine Erhöhung der *Hmnr*-Expression nach MI nachgewiesen werden. Missinato *et al.* gehen davon aus, dass die HA/RHAMM/FAK/Src-Signalkaskade wichtig für die epikardiale Zellfunktion ist [121], [122].

In unserer Arbeitsgruppe konnte bei der Analyse der Narbengröße bereits festgestellt werden, dass diese 3 Wochen nach I/R bei *Hmnr*-OE Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtyp (WT) Geschwistern signifikant reduziert war (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass RHAMM einen wichtigen Beitrag zur kardialen Regeneration nach MI leistet.

1.5 Ziele der Arbeit

In der Akutversorgung von MI-Patienten und Patientinnen wurden in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht. Trotzdem ist die Langzeitprognose dieser Patienten weiterhin eingeschränkt. Aus diesem Grund ist die Entwicklung langfristiger Therapiekonzepte nach MI in den vergangenen Jahren immer mehr in den Vordergrund gerückt. Hierfür bedarf es jedoch noch einiger Grundlagenforschung der Postinfarktphase.

Die EZM nimmt eine bedeutende Rolle im Heilungsprozess und *Remodeling* nach MI ein. Insbesondere HA reguliert viele inflammatorische sowie fibrotische Prozesse. So konnte in Tiermodellen bereits gezeigt werden, dass sich eine verminderte HA-Synthese und HA-Signaltransduktion nach MI negativ auf das *Outcome* der Tiere auswirkte [116], [118], [117]. Ebenfalls wurde die Bedeutung des HA-Rezeptors RHAMM zur postischämischen Regeneration des Herzens untersucht [121]. Allerdings ist die genaue Auswirkung der HA/RHAMM-Interaktion, insbesondere auf die Funktion der Immunzellen und Fibroblasten, noch nicht vollständig geklärt. Zudem wurde lediglich die *Hmmr*-Defizienz analysiert, eine *Hmmr*-Überexpression hingegen noch nicht. Deshalb ergibt sich weiterhin die Frage wie sich eine vermehrte HA-Signaltransduktion nach MI, speziell eine vermehrte HA/RHAMM-Interaktion, auf die inflammatorischen und reparativen Prozesse auswirkt.

Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit spezifisch die Rolle des HA-Rezeptors RHAMM nach MI geprüft werden. Zu diesem Zweck wurden *Hmmr*-OE Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen nach I/R untersucht. Dabei sollte die Zellkomposition, insbesondere die Immunzell- und Fibroblasten-Antwort, post I/R analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuche

2.1.1 Genehmigung

Die Genehmigung für Tierversuche wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen unter dem Aktenzeichen 81-02.04.2020.A289 erteilt. Die Anzeige zur Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken nach §4 Tierschutzgesetz erfolgte über die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Eine Teilnahme am Kursteil entsprechend dem Modul D hat stattgefunden. Hierbei erfolgte die Vermittlung von notwendigen Kenntnissen und praktischen Fähigkeiten zum Töten von Wirbeltieren der Spezies Maus und Ratte.

2.1.2 Mäuse

Alle *in vivo* Experimente wurden mit männlichen Mäusen im Alter von 12-14 Wochen mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6J durchgeführt.

Die *Hmmr*-OE Mäuse wurden selbst generiert. Hierzu wurde ein Mausmodell genutzt, welches im *Rosa26* Locus dem CAG-Promoter nachgelagert die *Hmmr* cDNA enthält. Zwischen dem CAG-Promoter und der *Hmmr* cDNA ist zudem eine LoxP-flankierte Stopp-Kassette eingelagert, welche die Transkription der cDNA zunächst verhindert (Abb. 4). Um eine induzierte *Hmmr* OE Mauslinie zu züchten wurden die oben beschriebenen modifizierten männlichen Mäuse mit Cre-Rekombinase exprimierenden weiblichen Mäusen gepaart. Durch die Kombination mit einer Cre-Rekombinase wird die LoxP-Erkennungssequenz mit der enthaltenen Stopp-Kassette herausgeschnitten und abgebaut. So erfolgt die Anbindung der *Hmmr* cDNA an den CAG-Promoter und die Genexpression erfolgt [123]. Um die *Hmmr*-Expression später sichtbar machen zu können wurde die *Hmmr* cDNA mit der *tdTomato*-Sequenz gekoppelt, die für das fluoreszierende *tdTomato*-Protein kodiert.

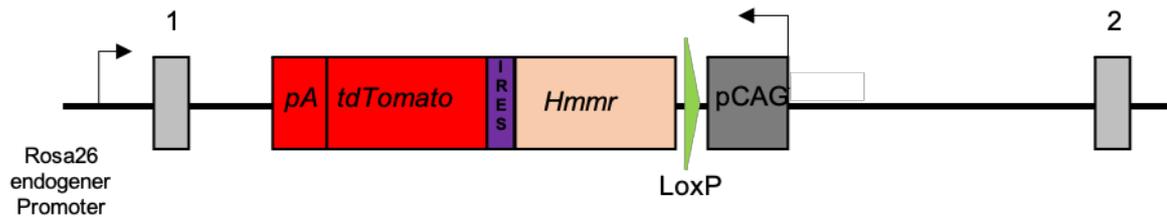


Abbildung 4: Schema des Rosa26 Locus mit *Hmnr*-tdTomato-OE-Konstrukt.
 pA=Poly-A-Schwanz, pCAG= CAG-Promoter.

Da der *Rosa26* Locus ubiquitär in allen Zellen exprimiert wird [124], führt dies zu einer starken ubiquitären Expression des RHAMM Proteins (s. Abb. 5).

Die Kontrollmäuse haben einen reinen wildtypischen C57BL/6J Hintergrund. Alle Mäuse, die nachweislich durch eine ST-Hebung im EKG eine myokardiale Ischämie hatten, nicht verstorben oder erkrankt sind wurden in die Experimente eingeschlossen. Die Mäuse erhielten zu jeder Zeit Futter und Wasser *ad libitum* und wurden in einem normalen 12-Stunden Tag-/Nachtrhythmus gehalten.

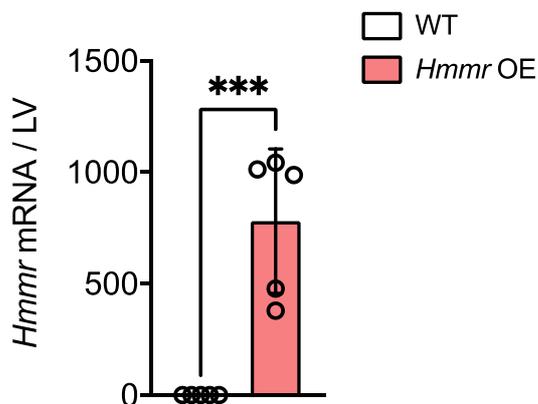


Abbildung 5: *Hmnr* mRNA Expression des Gewebes des linken Ventrikels (LV) naiver Herzen.
 WT= Wildtyp, *Hmnr* OE= *Hmnr*-überexprimierend. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n = 5,5. Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet, *** $p < 0,001$. Die Daten dieser Abbildung wurden von Dr. Anne Petz erhoben.

2.1.3 Durchführung der Ischämie und Reperfusion

Die Mäuse wurden nach einem geschlossenen Thoraxmodell der myokardialen Ischämie und Reperfusion, einem zweizeitigen Vorgehen mit temporärer Okklusion des Ramus intraventricularis anterior, einer der beiden Äste der linken Koronararterie (LAD; *left anterior descending*), operiert. Zur Einleitung der Anästhesie wurden Ketamin (90mg/kg Körpergewicht (KG)) und Xylazin (15mg/kg KG) verabreicht. In ausreichender Narkose wurden die Mäuse auf einer Intubationsvorrichtung rekliniert und mithilfe einer peripheren Venenverweilkanüle (20G) intubiert. Danach wurden die Mäuse auf einem 37°C erwärmten Operationstisch an den Extremitäten fixiert. Während der Operation erfolgte die Beatmung und Narkose durch ein Gasgemisch aus 2/3 Raumluft, 1/3 100% Sauerstoff und 2% Isofluran (V/V; Forene®, Abbott GmbH, Deutschland). Die Einstellung des Beatmungsgerätes betrug ein Tidalvolumen von 10µl/g KG und eine Beatmungsfrequenz von 140 Atemzügen/Minute (min). Für die Thorakotomie wurde auf der linken Seite ein parasternaler Hautschnitt von 1cm Länge durchgeführt. Die Thorakotomie erfolgte im dritten Interkostalraum mit einem Schnitt von 0,5cm Länge. Am offenen Herzen wurde dann die LAD ca. 1mm kaudal des linken Herzohres mit einer 7-0-Prolene-Naht (Ethicon, New Jersey, USA) umschlungen. Die Nadel wurde vom Faden entfernt. Beide Enden des Fadens wurden durch einen etwa 0,1cm dicken Polyethylen-Ring (PE-10) gefädelt und bildeten somit eine lockere Schleife um die LAD. Die Fadenenden wurden durch die Muskelschichten ausgeleitet und in einer präparierten Hauttasche am rechten Thorax belassen. Der Thorax wurde durch eine Hautnaht mit 5-0-Prolenefaden (Ethicon, New Jersey, USA) verschlossen. Bei der Ausleitung der Narkose wurde den Mäusen das Analgetikum Buprenorphin (0,1mg/kg KG) subkutan verabreicht. Nach Erwachen wurden die Mäuse extubiert. Bis zum vollständigen Erwachen wurden die Mäuse auf einer 38°C warmen Wärmeplatte überwacht und in engmaschigen Abständen kontrolliert. Drei Tage nach der Thorakotomie wurden die Mäuse in einer Inhalationsnarkosekammer mit 2/3 Raumluft, 1/3 Sauerstoff und 3% Isofluran erneut narkotisiert. Nach erfolgreicher Anästhesie erfolgte die Überleitung auf einen vorgewärmten Operationstisch. Dort wurde die Naht der Hauttasche am rechten Thorax eröffnet und die Prolenefäden freipräpariert. Die Fadenenden wurden dann beidseits an Magnethaltern fixiert. Daraufhin erfolgte die Ischämie durch Zug an den Magnethaltern. Die durchgeführte Ischämie wurde durch eine ST-Hebung im EKG

kontrolliert. Nach 45-minütiger Ischämie erfolgte die Reperfusion durch Durchtrennung der Fäden. Anschließend wurde eine Hautnaht mit einem 5-0-Prolenefaden durchgeführt und die Mäuse wie bereits oben beschrieben aus der Narkose ausgeleitet.

Die operative Induktion der myokardialen I/R der Mäuse wurde von Frau Dr. Simone Gorressen durchgeführt.

2.2 Präparation der Herzen

Die Mäuse wurden 1 Woche oder 72 Stunden (h) nach I/R durch eine CO₂-Narkose getötet. Während der Organentnahme wurden die Herzen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) gespült. Die Herzen, welche für die Genexpressionsanalyse bestimmt waren, wurden nach der Entnahme kurz in PBS belassen. Daraufhin wurde der linke Ventrikel (LV) präpariert und dieser bei -80°C eingefroren.

Die Herzen für die histologischen Analysen wurden nach der Entnahme in phosphatgepufferter 4% Formaldehydlösung (ROTI®Histofix 4 %; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Nach 24h wurden die Herzen in PBS überführt. Danach wurden sie entwässert und in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe des Mikrotoms (Rotationsmikrotom RM2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) wurden die Herzen von der Herzspitze an in 5µm Schnitte in 10 Ebenen geschnitten. Jede Ebene betrug 100µm und zwischen den Ebenen wurden jeweils 250µm verworfen. Bei den Ebenen 1, 2, 9 und 10 wurden jeweils 50µm aufgenommen. Ebene 3 bis 8 wurden vollständig, also je 100 µm, aufgenommen. Nach einem Tag bei Raumtemperatur (RT) wurden die Schnitte für eine Stunde bei 60°C hitzefixiert.

2.3 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *realtime*-PCR

Um die mRNA-Expression von *Hmnr*, *Acta2* und *Postn* im LV eine Woche nach I/R zu bestimmen wurden die Zellen mittels PeqGOLD TriFast (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) lysiert und die RNA extrahiert.

2.3.1 RNA-Extraktion

Zunächst wurden in gentleMACS™ M Tubes (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland) 1ml Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) pro 50-100mg Gewebe vorgelegt. Die eingefrorenen Gewebe-Proben wurden dann direkt hinzugegeben und die Dissoziation erfolgte. Daraufhin wurden die Röhren bei 3000 *rounds per minute* (rpm) und 4°C für 2 min zentrifugiert (*Centrifuge 5424R*; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Das entstandene Lysat wurde dann in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Nach der Zugabe von 200µl Chloroform (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) pro 1ml Trizol und einer Inkubation von 3 min bei RT, wurden die Proben 15 min bei RT und 15000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. In diese wurden dann 500µl Isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hinzugegeben. Die Ausfällung der RNA erfolgte während einer Inkubation von 10 min bei RT mit darauffolgender Zentrifugation und Sedimentation für 30 min bei 4°C und 15000 rpm. Der Überstand wurde abgesaugt und das erhaltene Zellpellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und für 10 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand erneut abgesaugt und die RNA bei 65°C getrocknet, sodass das Ethanol verdunstete. Daraufhin wurde die RNA in 30µl RNA-freiem Wasser gelöst und bei 65°C für 10 min inkubiert. Die Konzentration sowie die Qualität der RNA wurden mit Hilfe eines NanoDrop™ 1000 Spektrophotometers (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) durch Messungen der Absorption bei 230nm, 260nm und 280nm bestimmt.

2.3.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 1µg der isolierten RNA genutzt. Dazu wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet und die cDNA nach Herstellerprotokoll synthetisiert. Hierzu wurde die

RNA in 12µl H₂O gelöst, mit 2µl *DNA-wipe* Puffer gemischt und bei 42°C für 2 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Daraufhin wurden 4µl *realtime*-Puffer, 1µl Primer und 1µl Enzym hinzugemischt und die Mischung bei 42°C für 30 min und danach bei 95°C für 3 min inkubiert. Nach der Reaktion wurden die Proben mit 100µl H₂O aufgefüllt.

2.3.3 Quantitative *realtime*-PCR

Mithilfe des Platin SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies, Eugene, OR, USA) unter Verwendung eines StepOnePlus-Real-Time-PCR-Systems (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) wurde die quantitative *realtime*-PCR durchgeführt. Zur Berechnung der relativen mRNA-Expression wurde die $\Delta\Delta C(t)$ -Methode mit 18S als interne Kontrolle herangezogen. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 1 dargestellt. Alle Primer sind selbst entworfen und von ThermoFisher, Waltham, MA, USA hergestellt.

Gen	Symbol	Vorwärts-Primer 5'-3'	Rückwärts-Primer 5'-3'
18S ribosomale RNA	<i>Rn18s</i>	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
<i>Hyaluronan mediated motility receptor</i>	<i>Hmmr</i>	CAACTGCAGAACAACTGACG C	TCAAGATGGCTTGGGCGTG
<i>Actin Alpha 2, Smooth Muscle</i>	<i>Acta2</i>	CAGGCATGGATGGCATCAAT CAC	ACTCTAGCTGTGAAGTCAGT GTCTG
Periostin	<i>Postn</i>	CTGAAAAACAGACTCGGGAA	AAACTCTGTGGTCTGGCCT CTGGG

Tabelle 1: Quantitative *realtime*-PCR Primersequenzen

Material	Katalognummer	Hersteller
Chloroform	Y015.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße 2ml	0030120094	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
GentleMACS™ M Tubes	130-093-236	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
Isopropanol	I9516	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	20531	Qiagen, Hilden, Deutschland
Trizol	15-596-018	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 2: Verwendete Materialien zur Genexpressionsanalyse

2.4 Histologische Analyse

2.4.1 Allgemeiner Ablauf

Jede Färbung wurde auf je 3 Ebenen jedes Herzens durchgeführt. Hierzu wurden die Ebenen 3, 5 und 7 gefärbt. Bei der Isolectin/Weizenkeim-Agglutinin (WGA) Färbung wurden im Unterschied zu den anderen Färbungen die Ebenen 8, 9 und 10 jedes Herzens genutzt.

Im ersten Schritt der Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert. Hierzu wurden 3 aufeinanderfolgende Inkubationsschritte mit ROTICLEAR® (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für je 15 min durchgeführt. Danach folgte eine absteigende Ethanolreihe mit 100%, 95% und 70% Ethanol (Shell Deutschland Oil GmbH, Hamburg, Deutschland). Die Inkubationszeit betrug jeweils 2 min. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte zweimal für je 5 min in PBS gewaschen. Zur Antigendemaskierung wurde eine 1:10 Verdünnung des Citrat Puffers (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) mit pH 6.0 in destilliertem Wasser verwendet. In der erhitzten Lösung wurde für 20 min das *Antigen-Retrieval* durchgeführt. Darauf folgte eine Abkühlungsphase für 10 min. Nach der Abkühlung, wurden die Schnitte erneut zweimal für je 5 min in PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Schnitte mit Blockierlösung, bestehend aus Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS; ThermoFisher, Waltham, MA, USA), 10% fetalem bovines Serum (FBS; Gibco Life Technologies, Paisley, UK) und 1% bovinem Serumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), blockiert. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde in einer nassen dunklen Kammer bei RT. Nach erfolgter Blockierung wurden die einzelnen Herzschnitte getrocknet und mit einem hydrophoben Stift umrundet, sodass die spezifischen Antikörper (AK) nicht verlaufen. Die Erst-AK wurden in PBS mit 1% BSA verdünnt. Als letzter Schritt des ersten Tages wurden je 45µl der spezifischen AK-Lösung auf das jeweilige Herz pipettiert. Diese wurden dann über Nacht in einer nassen dunklen Kammer bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte für je 5 min zweimal in PBS gewaschen. Daraufhin wurde der Zweit-AK in PBS verdünnt. 45µl dieser Zweit-AK-Lösung wurden auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte bei RT in einer nassen dunklen Kammer für eine Stunde. Nach der Inkubation folgten erneut zwei Waschschrte für je 5 min in PBS. Zuletzt wurde auf jeden Herzschnitt ein Tropfen ROTI®Mount FluorCare DAPI (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gegeben und die Schnitte auf dem Objektträger

mit einem 24x50 mm großen Deckglas (Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland) bedeckt. Die Verdünnungen aller AK finden sich in Tabelle 3.

Bis zur Mikroskopie wurden die Schnitte bei 4°C aufbewahrt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mithilfe eines Zeiss AxioImager2-Mikroskops, 20x/0,8 Objektiv, unter Verwendung der Software ZEN 2 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen.

2.4.2 Mesenchymzellen-Färbung

Der Nachweis der Mesenchymzellen wurde mit einem Anti-Vimentin-AK (Abcam, Cambridge, UK) als Erst-AK und einem Alexa Fluor (AF) 647-Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Zur Isotyp-Kontrolle wurde ein rekombinanter Kaninchen IgG-AK (Abcam, Cambridge, UK) verwendet.

2.4.3 Makrophagen-Färbung

Für die Makrophagen Färbung wurden zwei unterschiedliche Oberflächenmarker analysiert. Zuerst wurde der Marker Mac-2, auch Galectin-3 genannt, angefärbt. Hierzu wurde als erster AK ein Anti-Mac-2-AK (Abcam, Cambridge, UK) verwendet. Als Zweit-AK wurde ein AF 647-Ziege-Anti-Ratte-IgG-AK (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) eingesetzt. Die Isotyp-Kontrolle wurde mit einem Ratte-IgG2a-AK (Cedarlane, Ontario, Kanada) durchgeführt.

Zusätzlich wurde der Makrophagen-Marker CD68 angefärbt. Für diesen Nachweis wurde der Anti-CD68-AK (Abcam, Cambridge, UK) als Erst-AK und AF 647-Ziege-Anti-Kaninchen-IgG als Zweit-AK verwendet. Zur Kontrolle wurde ein polyklonaler Kaninchen-IgG-AK (Abcam, Cambridge, UK) eingesetzt.

2.4.4 Fibroblasten-Färbung

Zum Nachweis der Fibroblasten wurden ebenfalls zwei verschiedene Oberflächenmarker angefärbt. Zunächst wurden die Schnitte für den α -SMA-Nachweis mit Anti- α -SMA (Abcam, Cambridge, UK) inkubiert. Als Zweit-AK wurde dann ein AF 647-Ziege-Anti-Kaninchen-IgG verwendet.

Für die zweite Fibroblasten-Färbung, dem *Postn*-Nachweis, war ein zusätzlicher Schritt notwendig. Zu der Citrat-Pufferlösung für die Antigendemaskierung wurden 0.08% Tween[®] 20 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

hinzugefügt. Dies wird genutzt um die Permeabilität der Zellmembran zu steigern. Als erster AK wurde dann Anti-Periostin (LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA) genutzt, gefolgt von AF 647-Ziege-Anti-Kaninchen-IgG. Zur Isotyp-Kontrolle beider Fibroblastennachweise wurde ebenfalls ein polyklonaler Kaninchen-IgG verwendet.

2.4.5 Proliferations-Färbung

Für die Färbung proliferierender Zellen wurden ebenfalls 0.08% Tween[®] 20 zur Citrat-Pufferlösung für das *Antigen-Retrieval* hinzugegeben. Außerdem wurde nach zweimaligem Waschen nach dem *Antigen-Retrieval* ein *Avidin-Biotin-Blocking* (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) durchgeführt, da daraufhin biotinylierte AK verwendet wurden. Für die Blockierung wurden die Schnitte zuerst 10 min mit Avidin inkubiert. Daraufhin wurden die Herzschnitte für 5 min in PBS gewaschen und dann für 10 min mit Biotin inkubiert. Für den Nachweis der proliferierenden Zellen wurde ein biotinylierter Anti-Ki67-AK (eBioscience, San Diego, CA, USA) verwendet. Darauf folgte die Inkubation mit Ziege-Anti-Streptavidin-Cy5 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) als Sekundärantikörper. Die Isotyp-Kontrolle wurde mithilfe eines Ratte-IgG2a-kappa-AK (eBioscience, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

2.4.6 Endothelzell-Färbung

Auch zur Färbung der Endothelzellen wurde ein *Avidin-Biotin-Blocking* nach der Antigendemaskierung durchgeführt. Für den ersten Inkubationsschritt über Nacht wurde ein biotinyliertes Isolectin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) genutzt. Darauf folgend wurde ein Ziege-Anti-Streptavidin-Cy5-AK verwendet. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper folgte ein weiterer Inkubationsschritt für eine Stunde bei RT mit einem WGA-AF488-Konjugat (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Dieser Schritt wurde zur zusätzlichen Färbung der Zellmembran durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Schnitt nur mit dem Zweit-AK Ziege-Anti-Streptavidin-Cy5-AK und dem WGA-AF488-Konjugat gefärbt.

2.4.7 Quantifizierung

Die Quantifizierung der gefärbten Schnitte wurde unter Verwendung der *ImageJ Software Version 2.1.0* (NIH, Bethesda, MD, USA) durchgeführt. Hierzu wurden zunächst *Thresholds* festgelegt. Diese definieren welche Signale von der Software berücksichtigt werden sollen und welche nicht. Für jede Färbung wurde ein individueller *Threshold* festgelegt, der sogenannte *Flat Threshold*. Neben diesem wurden für jede Färbung zwei in der Software bereits etablierte *Thresholds* (‘*RenyiEntropy*’ und ‘*Moments*’) angewendet. Im nächsten Schritt wurden *Regions of Interest* (ROI) für jedes Herz individuell eingezeichnet. Diese legen das von der Software auszuwertende Areal fest. Für alle Herzen wurde jeweils das gesamte Herz und der linke Ventrikel (LV) als ROI bestimmt. Die Software kann daraufhin die positiven Signale, festgelegt durch den jeweiligen *Threshold*, in der jeweiligen ROI zählen. Die resultierenden Ergebnisse werden als Anteil positiver Signale an der Fläche präsentiert.

2.4.7.1 Quantifizierung der Endothelzell-Färbung

Zur Quantifizierung der Endothelzell-Färbung konnten keine *Thresholds* angewendet werden, da nur Isolectin-Signale die einer Zelle zuzuordnen waren, gezählt werden sollen. Aus diesem Grund wurden pro Herz je fünf 400x400µm große Quadrate im Randbereich des Myokards ausgewählt. In diesen Quadraten wurden dann die Isolectin-positiven Zellen manuell ausgezählt. Die Mittelwerte dieser fünf Auszählungen stellen das Ergebnis für die Ebene des jeweiligen Herzens dar.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
AF 647 Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (A-21245)	ThermoFisher, Waltham, MA, USA	1:200
AF 647 Ziege-Anti-Ratte-IgG (A-21247)	ThermoFisher, Waltham, MA, USA	1:200
Anti-CD68 AK (ab125212)	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Anti-Maus/Mensch Mac-2 (Galectin-3) (CL8942AP)	Cedarlane, Burlington, Kanada	1:150
Anti-POSTN/Periostin AK (LS-B10443)	LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA	1:50
Biotinylated Griffonia Simplicifolia Lectin I - B4 (B-1205)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	1:50
Kaninchen IgG, polyklonal – Isotyp Kontrolle (ab37415)	Abcam, Cambridge, UK	1:10000 (CD68) 1:5000 (αSMA) 1:250 (Periostin)
Kaninchen-Anti-Vimentin (ab92547)	Abcam, Cambridge, UK	1:200
Kaninchen-Anti-α-SMA (ab5694)	Abcam, Cambridge, UK	1:200
KI-67 monoklonaler AK, Biotin (13-5698-80)	eBioscience, San Diego, CA, USA	1:180
Ratte IgG2a - Isotyp Kontrolle (CLCR2A00)	Cedarlane, Ontario, Kanada	1:15
Ratte IgG2a kappa -Isotyp Kontrolle (13-4321-81)	eBioscience, San Diego, CA, USA	1:180
Rekombinanter Kaninchen IgG, monoklonal – Isotyp Kontrolle (ab172730)	Abcam, Cambridge, UK	1:1250
WGA-AF488-Konjugat (W-11261)	ThermoFisher, Waltham, MA, USA	1:200
Ziege-Anti-Streptavidin CY5 (438316)	ThermoFisher, Waltham, MA, USA	1:200

Tabelle 3: Verwendete Antikörper mit Verdünnung

Material	Katalognummer	Hersteller
Avidin/Biotin Blocking System	004303	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Bovines Serumalbumin	A7030	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Citratpuffer	ZYT-ZUC028-500	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Deckgläser 24x50mm	K12450	Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland
Fetales bovines Serum	26140087	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
PBS	10010023	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
ROTI®Histofix 4 %	P087.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ROTI®Mount FluorCare DAPI	HP20.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ROTICLEAR®	A538.5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TBS	BP2471-1	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Tween® 20	9127.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Materialien zur Histologischen Analyse

2.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der *GraphPad Prism Software Version 9.0.2* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Alle erhobenen Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) aus n Experimenten dargestellt. Statistische Ausreißer wurden mithilfe des *Grubb-Tests* ($\alpha = 0,05$) berechnet und von der Analyse ausgeschlossen. Beim Vergleich von zwei Datensätzen mit Normalverteilung wurde ein ungepaarter, zweiseitiger T-Test (*unpaired t-test*) angewendet. Die Normalverteilung wurde mit einem *Anderson-Darling-Test*, *Shapiro-Wilk-Test* und *Kolmogorov-Smirnov-Test* geprüft. Bei nicht vorliegender Normalverteilung wurde ein *Mann-Whitney-Test* angewendet. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 *Hmnr*-Expression 1 Woche nach Ischämie und Reperfusion

Wie zuvor beschrieben wurde die Expression der *Hmnr* mRNA naiver Herzen in der Arbeitsgruppe bereits untersucht. Hier wurde festgestellt, dass die *Hmnr* OE Mäuse bereits vor I/R eine signifikant höhere Expression der *Hmnr* mRNA aufweisen als ihre wildtypischen Geschwister (s. Abb. 5).

Um weitere aussagekräftige Ergebnisse bezüglich des Einflusses der *Hmnr* Überexprimierung nach I/R erzielen zu können, wurde die Genexpression des RHAMM-Proteins zusätzlich 1 Woche nach I/R analysiert. Hierzu wurde die mRNA-Expression des RHAMM-Proteins des linken Ventrikels mittels *qPCR* bestimmt. Es konnte nachgewiesen werden, dass auch 1 Woche nach I/R die *Hmnr*-Expression der *Hmnr* OE Mäuse signifikant höher ist als bei den WT-Mäusen (s. Abb.6).

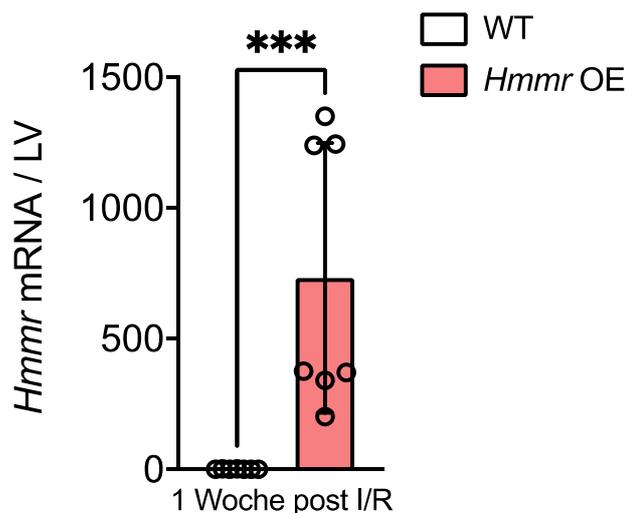


Abbildung 6: *Hmnr* mRNA Expression des Gewebes des linken Ventrikels 1 Woche post I/R. Die Expression der mRNA des *Hmnr*-Gens wurde mittels *qPCR* bestimmt. Diese wurde aus dem linken Ventrikel (LV) der *Hmnr*-überexprimierenden (*Hmnr* OE) Mäuse und Wildtyp (WT) Mäuse bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; $n = 7,7$. Die Signifikanzen wurden mit dem *Mann-Whitney-Test* berechnet, *** $p < 0,001$.

3.2 Einfluss von RHAMM auf postischämische Inflammation

Um den Einfluss von RHAMM auf die lokale Immunantwort im Herzen nach MI zu analysieren, wurde die Zellkomposition der *Hmmr*-OE und WT-Mäuse 1 Woche nach I/R bestimmt. Hierzu wurden histologische Färbungen der verschiedenen Zelltypen auf jeweils 3 festgelegten Ebenen jedes Herzens durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert der 3 Ebenen und dem prozentualen Anteil der positiven Fläche dargestellt. Zudem werden die Ergebnisse des gesamten Herzens (WH) und des linken Ventrikels (LV) gezeigt. Zur Genexpressionsanalyse einiger Zelltypen wurden zudem *qPCRs* durchgeführt. Diese Ergebnisse beziehen sich auf den linken Ventrikel.

3.2.1 Reaktion der Mesenchymzellen

Um die Reaktion der Mesenchymzellen zu analysieren wurden immunhistochemische Färbungen des Proteins Vimentin, ein Protein des Zytoskeletts mesenchymaler Zellen, durchgeführt. Im Vergleich zwischen den *Hmmr* OE und WT-Mäusen 1 Woche nach I/R kann hinsichtlich der Reaktion der Mesenchymzellen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (s. Abb. 7).

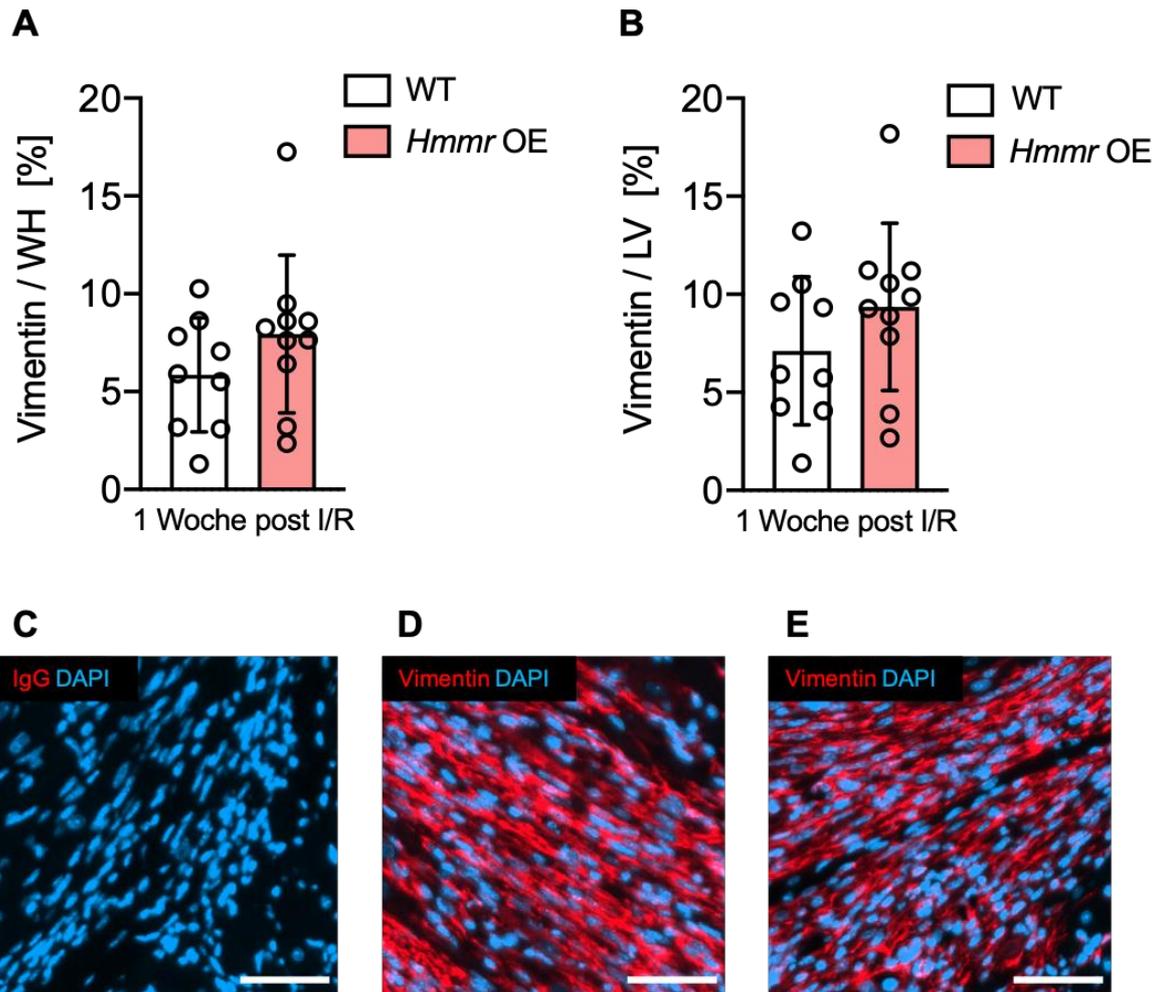


Abbildung 7: Immunhistochemische Untersuchung der Mesenchymzellen 1 Woche nach I/R. Quantifizierung der immunhistochemischen Vimentin-Färbung von *Hmnr*-überexprimierenden (*Hmnr* OE) Mäusen und Wildtyp (WT) Mäusen 1 Woche nach I/R. **A:** Gesamtes Herz (WH), **B:** Linker Ventrikel (LV). Dargestellt sind Mittelwert \pm SD; n = 9,10. *Threshold: Flat.* Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet. Repräsentative Bilder der Vimentin-Färbung. **C:** Kontrolle, **D:** Wildtyp, **E:** *Hmnr*-überexprimierend.

3.2.2 Immunantwort der Makrophagen

Zur Untersuchung der Immunantwort der Makrophagen wurde zunächst eine immunohistochemische Färbung 1 Woche nach I/R durchgeführt.

Hierzu wurde das Zelloberflächenprotein Mac-2, auch als Galectin-3 bezeichnet, welches von Makrophagen exprimiert wird, angefärbt. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Makrophagenantwort 1 Woche nach I/R zwischen den *Hmmr* OE Mäusen und ihren WT-Geschwistern festgestellt werden (s. Abb. 8).

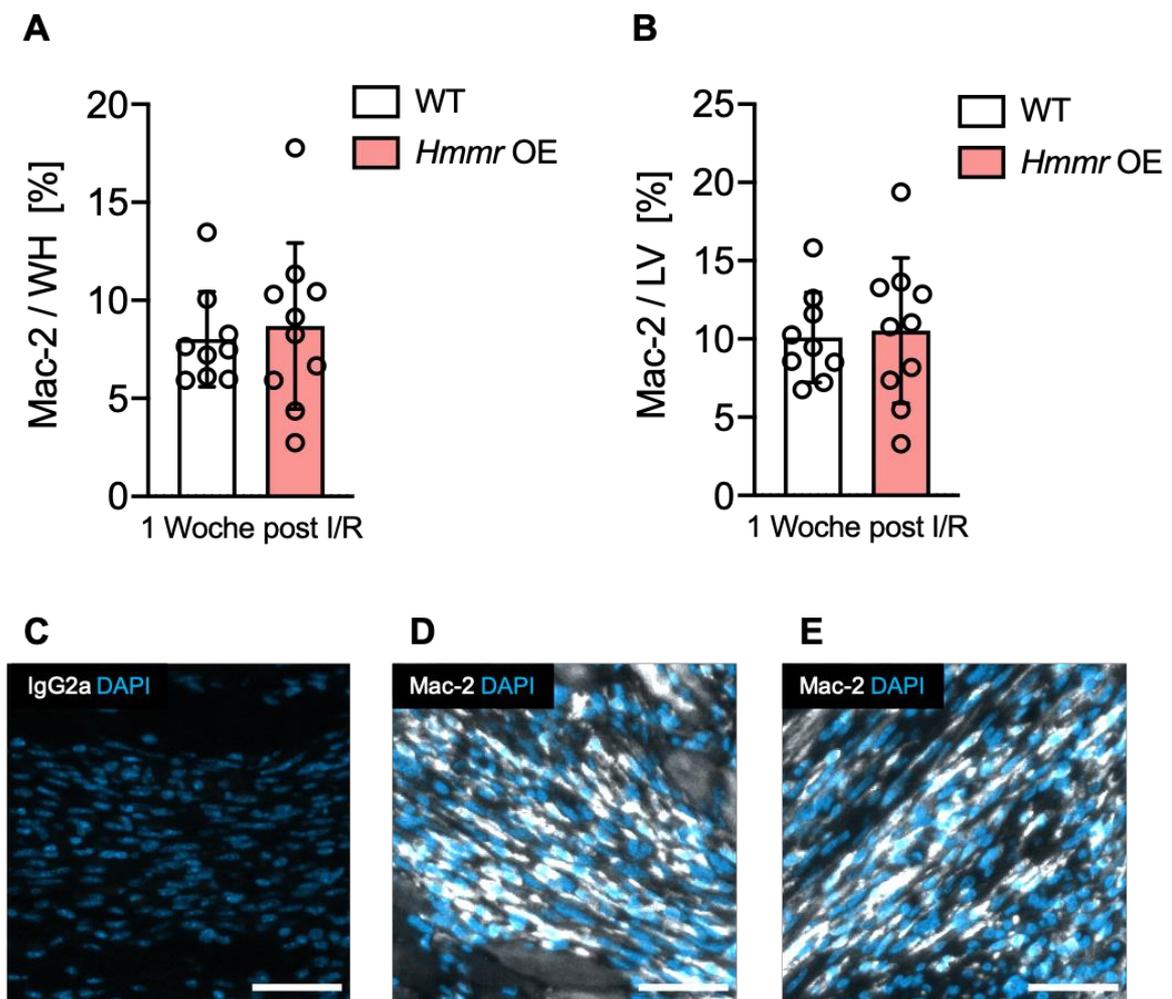


Abbildung 8: Immunhistochemische Untersuchung der Mac-2⁺ Makrophagen 1 Woche nach I/R. Quantifizierung der immunhistochemischen Mac-2-Färbung von *Hmmr*-überexprimierenden (*Hmmr* OE) Mäusen und Wildtyp (WT) Mäusen 1 Woche nach I/R. **A:** Gesamtes Herz (WH), **B:** Linker Ventrikel (LV). Dargestellt sind Mittelwert \pm SD; n = 9,10. *Threshold: Flat.* Die Signifikanzen wurden mit dem *Mann-Whitney-Test* berechnet. Repräsentative Bilder der Mac-2-Färbung. **C:** Kontrolle, **D:** Wildtyp, **E:** *Hmmr*-überexprimierend.

3.2.2.1 Immunantwort der Makrophagen 72 Stunden nach I/R

Zusätzlich wurde zur Analyse der Immunantwort der Makrophagen eine Untersuchung 72 Stunden nach I/R durchgeführt. Es wurde eine immunohistochemische Färbung eines weiteren Makrophagenmarkers, dem Protein CD68, angefertigt. Das Protein wird insbesondere von infiltrierenden Makrophagen und Gewebemakrophagen exprimiert. 72 Stunden nach I/R konnte ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Reaktion der CD68⁺ Makrophagen zwischen den *Hmmr* OE und WT-Mäusen gezeigt werden. Die Anzahl der CD68⁺ Makrophagen war bei den *Hmmr* OE Mäusen signifikant geringer als bei den WT-Mäusen (s. Abb. 9).

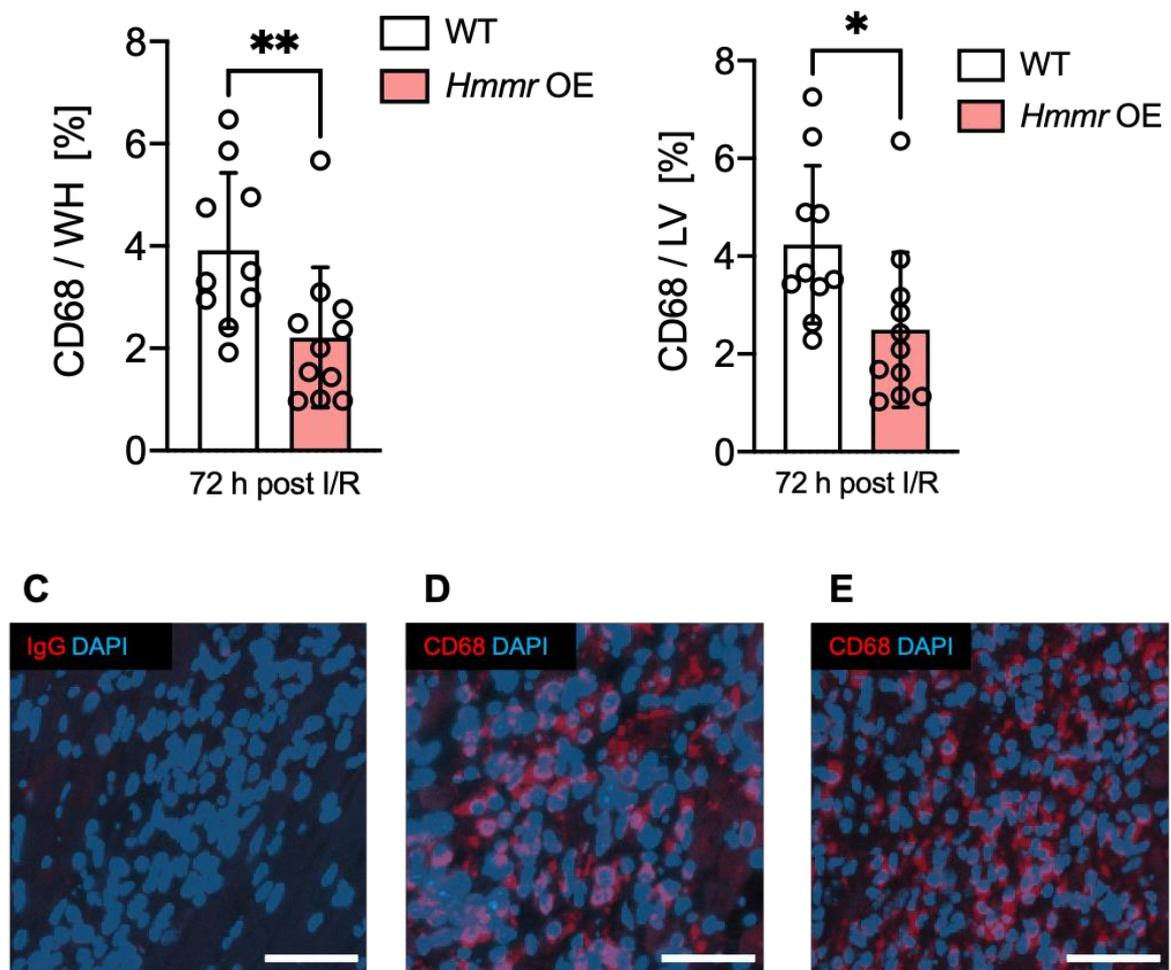


Abbildung 9: Immunhistochemische Untersuchung der CD68⁺ Makrophagen 72 Stunden nach I/R. Quantifizierung der immunhistochemischen CD68-Färbung von *Hmrr*-überexprimierenden (*Hmrr* OE) Mäusen und Wildtyp (WT) Mäusen 72 Stunden nach I/R. **A:** Gesamtes Herz (WH), **B:** Linker Ventrikel (LV). Dargestellt sind Mittelwert \pm SD; n = 9,10. *Threshold: Flat.* Die Signifikanzen wurden mit dem *Mann-Whitney-Test* berechnet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Repräsentative Bilder der CD68-Färbung. **C:** Kontrolle, **D:** Wildtyp, **E:** *Hmrr*-überexprimierend.

3.2.3 Antwort der Fibroblasten

Um die zelluläre Antwort der Fibroblasten zu analysieren, wurden zwei verschiedene Proteine, welche von aktivierten Myofibroblasten exprimiert werden, untersucht.

Zuerst wurde 1 Woche nach I/R auf den Herzen das Protein α -SMA angefärbt. Die Auswertung zeigt keinen signifikanten Unterschied der α -SMA-Expression im Herzen der *Hmmr* OE und WT-Mäuse (s. Abb.10).

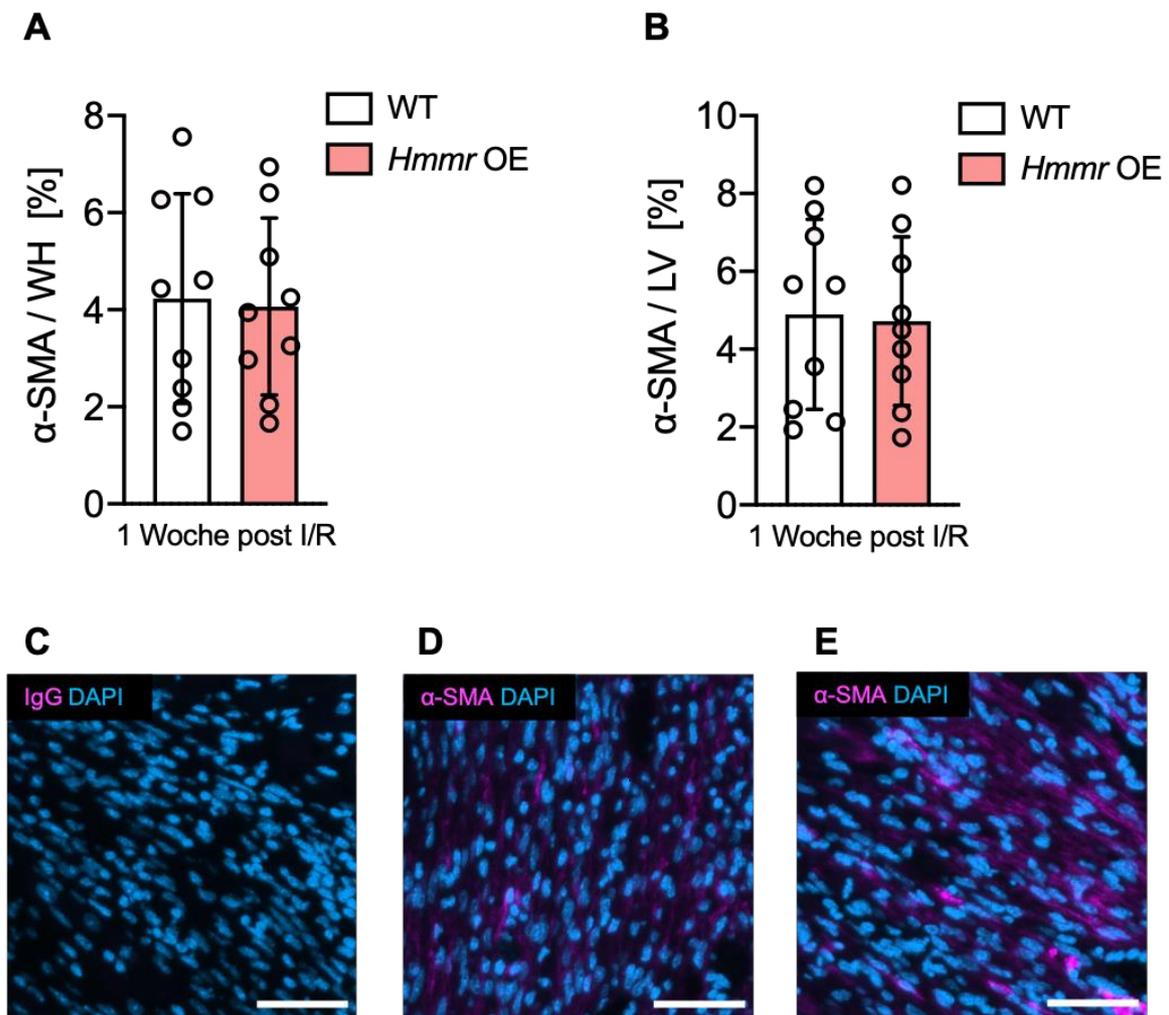


Abbildung 10: Immunhistochemische Untersuchung der α -SMA⁺ Fibroblasten 1 Woche nach I/R. Quantifizierung der immunhistochemischen α -SMA-Färbung von *Hmmr*-überexprimierenden (*Hmmr* OE) Mäusen und Wildtyp (WT) Mäusen 1 Woche nach I/R. **A:** Gesamtes Herz (WH), **B:** Linker Ventrikel (LV). Dargestellt sind Mittelwert \pm SD; n = 9,9. *Threshold: Flat.* Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet.

Repräsentative Bilder der α -SMA-Färbung. **C:** Kontrolle, **D:** Wildtyp, **E:** *Hmmr*-überexprimierend.

Um zu untersuchen ob dieses Ergebnis auch auf mRNA-Ebene vorliegt, wurde eine *qPCR* durchgeführt. Hierzu wurde die mRNA-Expression des *Acta2*-Gens, welches für das α -SMA-Protein kodiert, im linken Ventrikel der Herzen 1 Woche nach I/R bestimmt. Auch die mRNA-Expression weist keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Hmmr*-OE Mäusen und ihren WT-Geschwistern auf (s. Abb.11).

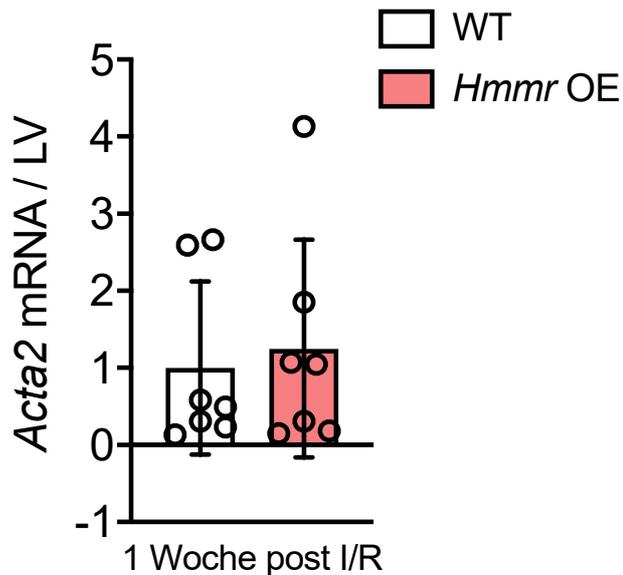


Abbildung 11: *Acta2* mRNA Expression des Gewebes des linken Ventrikels 1 Woche post I/R. Die Expression der mRNA des *Acta2*-Gens wurde mittels *qPCR* bestimmt. Diese wurde aus dem linken Ventrikel (LV) der *Hmmr*-überexprimierenden (*Hmmr* OE) Mäuse und Wildtyp (WT) Mäuse bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n = 7,7. Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet.

Neben α -SMA wurde auch Periostin (POSTN), ein Marker aktivierter Myofibroblasten, untersucht. Zunächst wurde eine immunohistochemische Färbung durchgeführt. 1 Woche nach I/R zeigt sich auch beim Periostin-Nachweis kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mauslinien (s. Abb. 12). Zudem wurde eine *qPCR* zur Genexpressionsanalyse von POSTN durchgeführt. Die Expression der mRNA des POSTN-Gens im linken Ventrikel 1 Woche nach I/R zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Hmmr* OE und WT-Mäusen (s. Abb. 13).

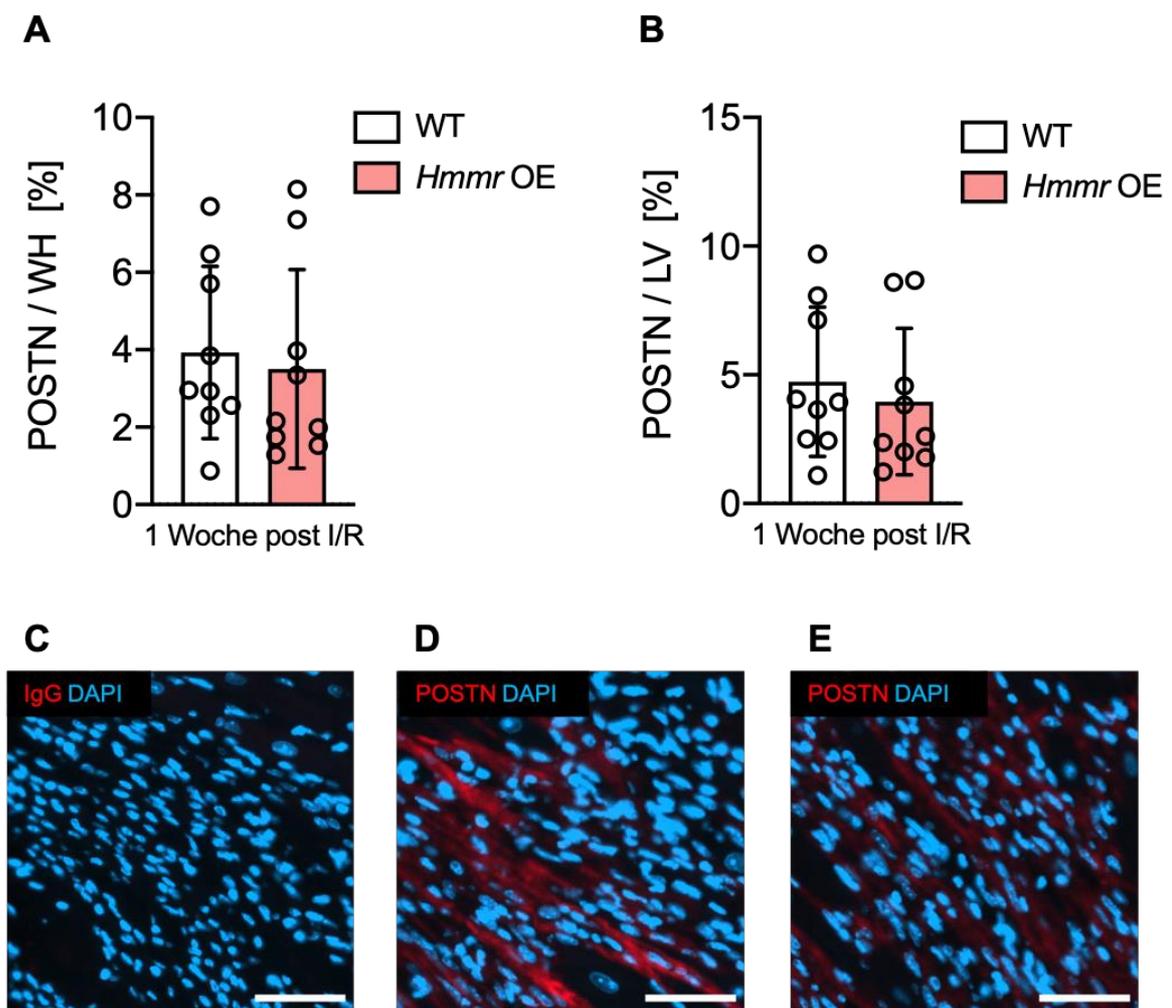


Abbildung 12: Immunhistochemische Untersuchung der Periostin⁺ Fibroblasten 1 Woche nach I/R. Quantifizierung der immunhistochemischen POSTN-Färbung von *Hmmr*-überexprimierenden (*Hmmr* OE) Mäusen und Wildtyp (WT) Mäusen 1 Woche nach I/R. **A:** Gesamtes Herz (WH), **B:** Linker Ventrikel (LV). Dargestellt sind Mittelwert \pm SD; n = 9,9. *Threshold: Flat.* Die Signifikanzen wurden mit dem *Mann-Whitney-Test* berechnet. Repräsentative Bilder der POSTN-Färbung. **C:** Kontrolle, **D:** Wildtyp, **E:** *Hmmr*-überexprimierend.

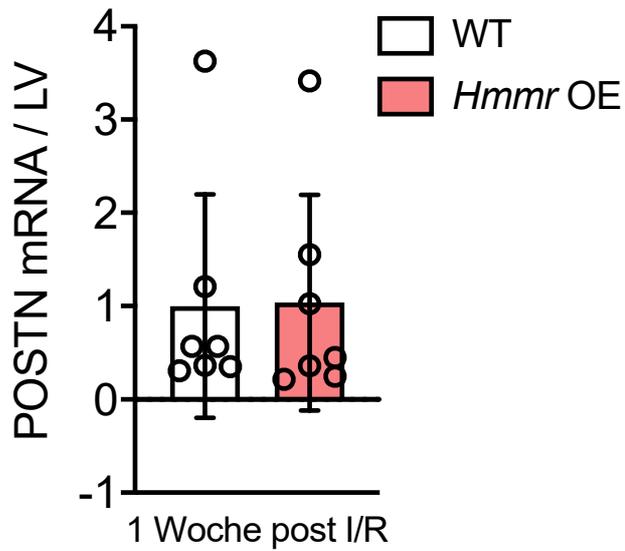


Abbildung 13: POSTN mRNA Expression des Gewebes des linken Ventrikels 1 Woche post I/R.

Die Expression der mRNA des POSTN-Gens wurde mittels *qPCR* bestimmt. Diese wurde aus dem linken Ventrikel (LV) der *Hmnr*-überexprimierenden (*Hmnr* OE) Mäuse und Wildtyp (WT) Mäuse bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; $n = 7,7$. Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet.

3.2.4 Reaktion der Endothelzellen

Zur Analyse der Endothelzellen wurde eine immunohistochemische Färbung durchgeführt. Der Nachweis erfolgte durch ein biotinyliertes Isolectin, welches an die Endothelzellen bindet. Dieses wurde durch einen fluoreszierenden AK sichtbar gemacht. Um die spätere Auswertung zu präzisieren wurden zusätzlich die Zellmembranen durch ein WGA-AF488-Konjugat angefärbt. 1 Woche nach I/R zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Anzahl der Endothelzellen im gesamten Herzen im Vergleich zwischen *Hmmr* OE und WT-Mäusen (s. Abb. 14).

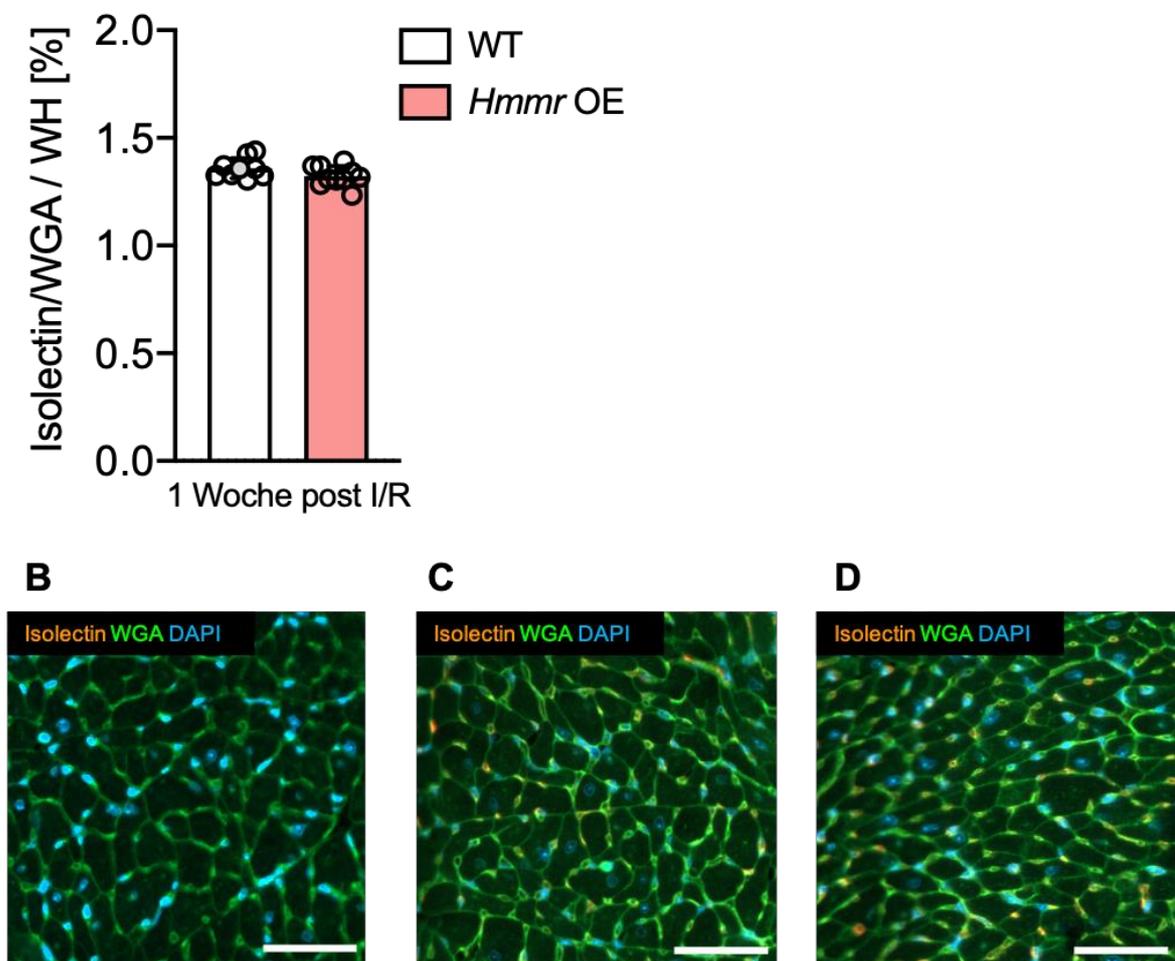


Abbildung 14: Immunhistochemische Untersuchung der Endothelzellen 1 Woche nach I/R.
A: Quantifizierung der immunhistochemischen Isolectin / Weizenkeim-Agglutinin (WGA)-Färbung von *Hmmr*-überexprimierenden (*Hmmr* OE) Mäusen und Wildtyp (WT) Mäusen 1 Woche nach I/R. Gesamtes Herz (WH). Dargestellt sind Mittelwert \pm SD; $n = 9,10$. Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet.
Repräsentative Bilder der Isolectin/ Weizenkeim-Agglutinin-Färbung. **B:** Kontrolle, **C:** Wildtyp, **D:** *Hmmr*-überexprimierend.

3.3 Einfluss von RHAMM auf postischämische Zellproliferation

Um den Einfluss von RHAMM auf die Zellproliferation nach MI zu untersuchen wurden ebenfalls immunohistochemische Färbungen angefertigt. Als Proliferationsmarker wurde das Ki67-Antigen genutzt. Dieses Antigen wird während des Zellzyklus (G1-, S-, G2-, M-Phase) exprimiert. Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, also nicht proliferieren, exprimieren es hingegen nicht.

3.3.1 Lokale Proliferation 1 Woche nach Ischämie und Reperfusion

Die erste Färbung wurde auf den Herzen der *Hmmr* OE und WT-Mäuse 1 Woche nach I/R durchgeführt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mauslinien. Die Anzahl der proliferierenden Zellen 1 Woche nach I/R, sowohl im gesamten Herz als auch im linken Ventrikel, ist bei den *Hmmr*-OE Mäusen signifikant geringer als bei den WT-Mäusen (s. Abb. 15).

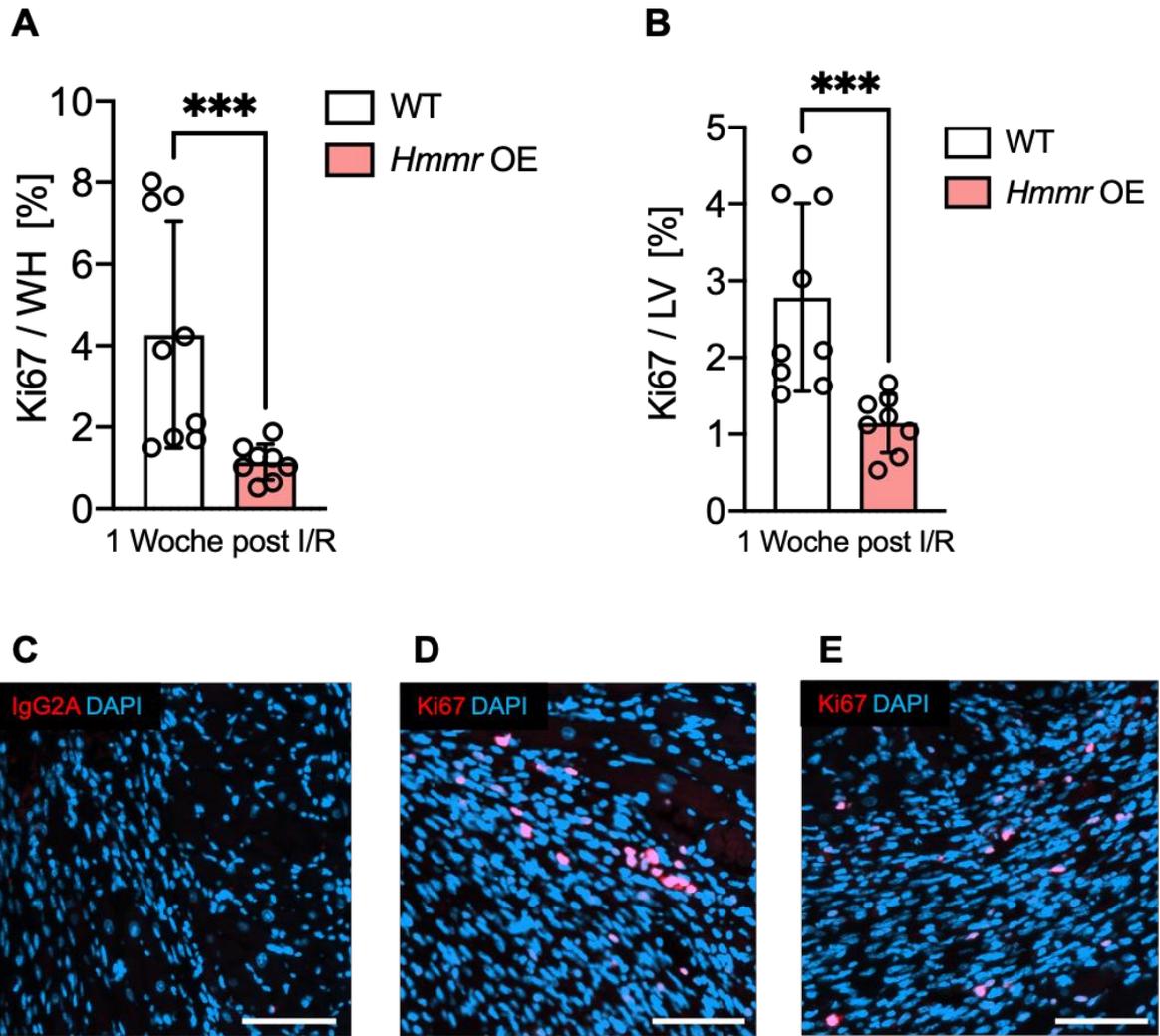


Abbildung 15: Immunhistochemische Untersuchung der Proliferationsrate 1 Woche nach I/R. Quantifizierung der immunhistochemischen Ki67-Färbung von *Hmnr*-überexprimierenden (*Hmnr* OE) Mäusen und Wildtyp (WT) Mäusen 1 Woche nach I/R. **A:** Gesamtes Herz (WH), **B:** Linker Ventrikel (LV). Dargestellt sind Mittelwert \pm SD; $n = 9,8$. *Threshold: Flat*. Die Signifikanzen wurden mit dem *Mann-Whitney-Test* berechnet. *** $p < 0,001$. Repräsentative Bilder der Ki67-Färbung. **C:** Kontrolle, **D:** Wildtyp, **E:** *Hmnr*-überexprimierend.

3.3.2. Lokale Proliferation 72 Stunden nach Ischämie und Reperfusion

Um die Proliferationsrate auch kurz nach MI zu charakterisieren wurden zudem immunohistochemische Färbungen auf den Herzen 72 h nach I/R durchgeführt. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl proliferierender Zellen zwischen den *Hmmr* OE Mäusen und den WT-Mäusen (s. Abb. 16).

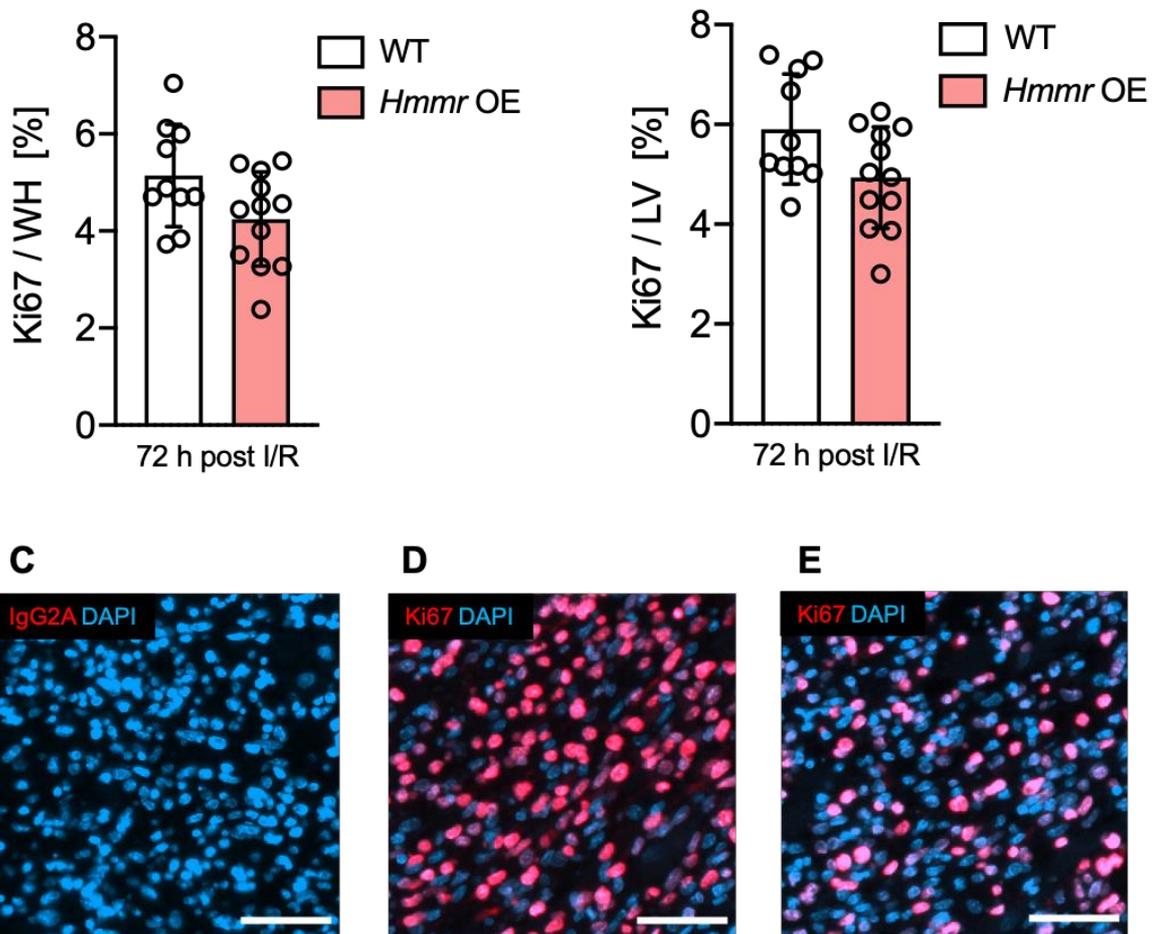


Abbildung 16: Immunohistochemische Untersuchung der Proliferationsrate 72 Stunden nach I/R. Quantifizierung der immunohistochemischen Ki67-Färbung von *Hmmr*-überexprimierenden (*Hmmr* OE) Mäusen und Wildtyp (WT) Mäusen 72 Stunden nach I/R. **A:** Gesamtes Herz (WH), **B:** Linker Ventrikel (LV). Dargestellt sind Mittelwert \pm SD; $n = 10,12$. *Threshold: Flat*. Die Signifikanzen wurden mit dem *Mann-Whitney-Test* berechnet. Repräsentative Bilder der Ki67-Färbung. **C:** Kontrolle, **D:** Wildtyp, **E:** *Hmmr*-überexprimierend.

4 Diskussion

Wie einleitend bereits erwähnt wurden hinsichtlich der Akuttherapie des Myokardinfarkts zuletzt große Fortschritte gemacht. Die therapeutischen Möglichkeiten nach einem überstandenen MI sind jedoch immer noch nicht ausreichend. So haben Patienten nach MI ein erhöhtes Risiko für das Auftreten weiterer kardiovaskulärer Ereignisse und eine damit verbundene erhöhte Mortalität. Insbesondere das Risiko eines Re-Infarkts innerhalb des ersten Jahres nach MI ist deutlich erhöht [125], [126]. Um das individuelle Risiko des einzelnen Patienten zu reduzieren wird diesen empfohlen ihren Lebensstil anzupassen. Dazu gehören Maßnahmen wie mit dem Rauchen aufzuhören, Gewicht zu verlieren und regelmäßige körperliche Aktivität in den Alltag zu integrieren [127]. Zudem werden langzeittherapeutisch antithrombotische und kardioprotektive Medikamente eingesetzt. Zur Thrombozytenaggregationshemmung wird eine lebenslange Einnahme von niedrig-dosiertem Aspirin empfohlen. Nach einer perkutanen Intervention wird eine duale Plättchenhemmung mit zusätzlich einem P2Y12-Inhibitor, wie Ticagrelor oder Prasugrel, für die ersten 12 Monate eingesetzt. Die orale Behandlung mit einem Betablocker ist bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder einer linksventrikulären Ejektionsfraktion $\leq 40\%$ indiziert [128], [129].

Es fehlt jedoch weiterhin an Therapien, die spezifisch auf die Umbau- und Inflammationsprozesse nach MI abzielen. Eine Ursache hierfür ist, dass diese postischämischen Phasen noch nicht genau verstanden sind und insbesondere bei der Inflammation viele verschiedene Prozesse eine Rolle spielen. Experimentelle Daten zeigen, dass spezifische, auf einen bestimmten Prozess abgestimmte Therapien, die Heilung positiv unterstützen können. Therapien, wie beispielsweise Glucocorticoide, die unspezifisch antiinflammatorisch wirken, beeinflussen die Heilung jedoch eher nachteilig [130].

Diese Arbeit weist daraufhin, dass eine vermehrte HA-Signaltransduktion einige dieser postischämischen Prozesse und das spätere *Outcome* positiv beeinflussen könnte.

4.1 Einfluss der *Hmmr* OE auf die kardiale Heilung post I/R

Die Analyse der Narbengröße, durchgeführt in unserer Arbeitsgruppe, zeigte, dass 3 Wochen post I/R die Narbengröße der *Hmmr* OE Mäuse signifikant reduziert war im Vergleich zu ihren WT-Geschwistern. Dies deutet auf eine verbesserte Heilung und ein positives *Remodeling* bei vermehrter HA/RHAMM-Signaltransduktion hin. Die Beobachtung, dass eine HA-Anreicherung im Myokard nach I/R wichtig für das spätere *Outcome*, insbesondere für die Narbengröße ist, zeigt sich auch in der Literatur. Bei einer Störung der HA-Anreicherung durch das Nicht-Vorhandensein der Hyaluronsäuresynthasen (*Has* 2 und 3) zeigte sich bei Mäusen eine ausgeprägtere kardiale Dysfunktion sowie eine Zunahme der Narbengröße im Vergleich zu WT-Mäusen [116], [117]. Auch die Relevanz des RHAMM-Rezeptors für die kardiale Regeneration konnte in Studien festgestellt werden. Bei Zebrafischen führte ein *Hmmr-Knockout* (KO) zu einer signifikanten Zunahme der Narbengröße [121]. Zudem zeigten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass auch bei *Hmmr* KO Mäusen die Narbengröße signifikant erhöht ist im Vergleich zu WT-Mäusen (Daten nicht gezeigt). Diese Daten und die Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigen deutlich, dass HA und auch die Signalkaskade über den RHAMM-Rezeptor zu einer verbesserten kardialen Heilung post I/R beitragen.

4.2 Einfluss der *Hmmr* OE auf die Zellantwort post I/R

Es kann davon ausgegangen werden, dass die HA-Rezeptoren eine wichtige Rolle für die beteiligten Zellen in der Postinfarktphase darstellen. In einer murinen Studie konnte festgestellt werden, dass der HA-Rezeptor CD44 auf der Mehrzahl der Gewebezellen im infarzierten Gewebe exprimiert wurde, unter anderem auf Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen [118]. Durch welche genauen Prozesse die HA/RHAMM-Signalkaskade die kardiale Heilung beeinflusst ist jedoch noch nicht geklärt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die genaue Zellkomposition nach I/R bei *Hmmr* OE Mäusen untersucht.

4.2.1 *Hmmr* OE und Mesenchymzellen

Die Analyse der Reaktion der Mesenchymzellen, mithilfe des mesenchymalen Zytoskelettproteins Vimentin, 1 Woche post I/R zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Hmmr* OE und den WT-Mäusen. Dies deutet zunächst daraufhin, dass die *Hmmr*-Überexprimierung keinen relevanten Einfluss auf die Antwort der Mesenchymzellen hat. In einer Studie aus dem Jahr 2022 konnte jedoch gezeigt werden, dass es eine enge Assoziation zwischen RHAMM und Vimentin an den Lamellopodien der Mesenchymzellen gibt. Es wird davon ausgegangen, dass auf diese Weise die HA/RHAMM/Vimentin-Signaltransduktion in geschädigtem Gewebe die Zellmigration der Mesenchymzellen beeinflusst [131]. Mit dem Hintergrund dieser Daten kann vermutet werden, dass die vermehrte Zellmigration der Mesenchymzellen schon zu einem früheren Zeitpunkt auftritt und 1 Woche nach I/R bereits abgeschlossen ist. Da außerdem festgestellt wurde, dass Vimentin eine Rolle in der Transition der Mesenchymzellen zu Myofibroblasten spielt, wird davon ausgegangen, dass auch dieser Prozess durch HA/RHAMM koordiniert wird [131], [132].

4.2.2 *Hmmr* OE und Fibroblasten

Aus diesem Grund könnte man vermuten, dass bei den *Hmmr* OE Mäusen eine erhöhte Zahl aktivierter Fibroblasten post I/R gefunden werden kann. Hinsichtlich der von Myofibroblasten exprimierten Proteine α -SMA und Periostin ist nach einer Woche jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den *Hmmr* OE und WT-Mäusen festzustellen. Dennoch scheint der RHAMM-Rezeptor Einfluss auf die aktivierten Myofibroblasten zu haben. Experimente zeigen, dass RHAMM entlang der α -SMA⁺ Filamente der Myofibroblasten lokalisiert ist und so vermutlich kontraktile und profibrotische Funktionen der Fibroblasten unterstützt [131]. Möglicherweise beeinflusst eine Überexprimierung des Rezeptors also die Funktion und weniger die Proliferation der Myofibroblasten. Diese Annahme wird von Daten aus dem Jahr 2020 unterstützt. Bei Experimenten mit Hautwunden bei Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferation dermalen Fibroblasten zwischen *Hmmr* KO und WT-Mäusen. Bei den *Hmmr* KO Mäusen zeigten sich hingegen funktionelle Defizite, insbesondere eine verminderte Migrationsgeschwindigkeit der Fibroblasten und eine schlechtere Reepithelialisierung der Wunden [133].

4.2.3 *Hmmr* OE und Endothelzellen

HA scheint eine wichtige Rolle in der Angiogenese und dem Aufbau eines neuen Gefäßsystems im ischämischen Gebiet zu spielen. Die Applikation eines HA-haltigen Hydrogels nach MI führte bei Ratten zu einer deutlich gesteigerten Neovaskularisierung und einer damit einhergehenden verbesserten kardialen Funktion im Vergleich zur Kontrollgruppe [120]. Um zu untersuchen ob der RHAMM-Rezeptor einen Einfluss auf diesen Prozess hat wurden die Endothelzellen 1 Woche nach I/R analysiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den *Hmmr* OE und den WT-Mäusen. Daten aus der Literatur weisen jedoch auf einen Einfluss des RHAMM-Rezeptors auf die Neovaskularisierung zu einem späteren Zeitpunkt hin. Ein *Hmmr* KO bei Zebrafischen führte zu einer verminderten Angiogenese 10 Tage nach MI. Der Grund dafür war eine verminderte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und Migration der epithelialen Zellen in das Infarktgebiet. Es wird vermutet, dass die HA/RHAMM-Interaktion diese für die Angiogenese relevanten Prozesse durch die Regulation des PDGF (*platelet derived growth factor*)-Signalweges beeinflusst [121]. Auch weitere Untersuchungen geben Hinweise auf einen Einfluss von RHAMM auf die Angiogenese und die Interaktion mit Endothelzellen [134], [135]. Auf welchem genauen Weg und zu welchem Zeitpunkt nach I/R RHAMM die Gefäßneubildung jedoch reguliert muss noch detaillierter analysiert werden.

4.2.4 *Hmmr* OE und Makrophagen

Die Immunreaktion der Makrophagen spielt eine wichtige Rolle in der Inflammation post I/R. Mit dem Model von *Has2* KO Mäusen konnte gezeigt werden, dass HA die Antwort der Makrophagen maßgeblich beeinflusst. Die Deletion der *Has2* und somit eine reduzierte HA-Synthese führte zu einer verstärkten Apoptose der kardialen Makrophagen nach I/R. Die zusätzliche Blockade des HA-Rezeptors CD44 induzierte zudem die Apoptose der aus dem Knochenmark stammenden Makrophagen. Petz *et al.* schlossen daraus, dass HA nach MI die Reaktion der Makrophagen durch die Bildung einer anti-apoptotischen Umgebung reguliert [116]. Um den Einfluss von RHAMM auf die Immunreaktion der Makrophagen zu untersuchen wurde diese anhand von zwei Makrophagen-Oberflächenmarkern, Mac-2 und CD68, zu zwei Zeitpunkten analysiert. 1 Woche nach I/R wurde kein signifikanter Unterschied der Mac-2⁺ Makrophagen zwischen den *Hmmr* OE und

ihren WT-Geschwistern festgestellt. Auch die Analyse der CD68⁺ Makrophagen 1 Woche nach I/R, durchgeführt in unserer Arbeitsgruppe, zeigte keinen signifikanten Unterschied (Daten nicht dargestellt). Zum Zeitpunkt 72 Stunden nach I/R zeigte sich jedoch, dass die Anzahl der CD68⁺ Makrophagen der *Hmmr* OE Mäuse signifikant geringer als die der WT-Mäuse war. Die Ergebnisse 1 Woche nach I/R könnten sich zunächst mit den Erkenntnissen von Petz *et al.* erklären lassen. Falls RHAMM ebenfalls einen Beitrag zur anti-apoptischen Umgebung für Makrophagen leistet, würde eine Überexprimierung zunächst nicht unbedingt zu einer erhöhten Anzahl von Makrophagen bei *Hmmr* OE Mäusen führen. Allerdings weisen weitere Daten auf einen anderen Einfluss von RHAMM auf Makrophagen hin. Analysen aus den Jahren 2005 und 2019 zeigten, dass RHAMM bei akuter Lungenschädigung eine eher funktionelle Wirkung auf Makrophagen hat. *Hmmr* KO Mäuse zeigten eine deutlich geringere Inflammation, insbesondere eine signifikant reduzierte Akkumulation und Motilität der Makrophagen, im Vergleich zu WT-Mäusen [136]. Zudem wurde eine selektive, zell-spezifische *Hmmr*-Überexprimierung nur in Makrophagen untersucht. Hier zeigte sich ein veränderter Phänotyp der Makrophagen sowie eine zell-spezifische Aktivierung einer gesteigerten Inflammation und einer nachfolgend gesteigerten Fibrose [113]. Diese Ergebnisse und auch die weiteren Studien lassen vermuten, dass der RHAMM-Rezeptor die Motilität und Proliferation der Makrophagen reguliert [137]. Gegebenenfalls wirkt sich eine allgemeine *Hmmr*-Überexprimierung weniger zell-spezifisch auf die Makrophagen aus, weswegen zum Zeitpunkt 1 Woche nach I/R kein Unterschied in der Anzahl der Makrophagen zu WT-Mäusen vorliegt. Das Ergebnis 72 Stunden nach I/R könnte daraufhin weisen, dass die Inflammation bei *Hmmr* OE Mäusen generell erst später einsetzt als bei WT-Mäusen. Dies sollte jedoch weiter untersucht werden, da dieser Prozess in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde und es sich durch weitere Daten bisher nicht erklären lässt.

4.3 Einfluss der *Hmmr* OE auf die Zellproliferation post I/R

Zur Analyse der Zellproliferation post I/R wurde der Proliferationsmarker Ki-67 genutzt. Die immunohistochemischen Färbungen 1 Woche nach I/R zeigten eine signifikante Reduktion des Proliferationssignals bei den *Hmmr* OE Mäusen im Vergleich zu ihren WT-Geschwistern. 72 h post I/R zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied der Proliferation. Dies deutet zunächst daraufhin, dass RHAMM die Zellproliferation gar nicht oder sogar nachteilig beeinflusst. Untersuchungen bezüglich der Rolle von HA und den beiden Hauptrezeptoren CD44 und RHAMM im humanen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) unterstützen diese Vermutung jedoch nicht. So führte die Reduktion der CD44- und *Hmmr*-mRNA in den untersuchten NSCLC-Zelllinien zu einer signifikant verringerten Proliferation. Die nachträgliche Zugabe exogener HA erhöhte hingegen die Proliferationsrate dieser Zelllinien wieder signifikant. Dieses Ergebnis deutet an, dass die Interaktionen CD44/HA und RHAMM/HA die Zellproliferation positiv beeinflussen, es aber auch noch andere Rezeptoren geben muss die die Proliferation durch die HA-Signaltransduktion steuern [138]. Zudem wurde in einer Studie aus dem Jahr 2012 die *Hmmr* OE in Osteoblasten untersucht. Die intrazelluläre Überaktivierung des Rezeptors führte durch eine Aktivierung der ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinases*) zu einer erhöhten Zellproliferation [139]. Weitere Daten unterstreichen, dass insbesondere intrazelluläres RHAMM durch die Interaktion mit ERK1/2 die Proliferation positiv beeinflusst. Auf der Zelloberfläche lokalisiertes RHAMM scheint hingegen einen geringeren Effekt auf die Proliferation zu haben [140]. Im Hinblick auf den Einfluss von RHAMM auf die postischämische Zellproliferation gibt es bisher nur wenig Daten. In Zebrafischen führte ein *Hmmr* KO jedoch zu keiner Veränderung der Proliferation der Kardiomyozyten nach I/R [121]. Mit diesem Hintergrund lässt sich zunächst vermuten, dass die geringere Proliferationsrate der *Hmmr* OE Mäuse 1 Woche nach I/R auf eine allgemein verminderte Aktivierung der Nicht-Kardiomyozyten-Zellpopulation auf Grund primär vermindelter ischämischer Schädigung zurückzuführen ist. Die in dieser Arbeit untersuchten Zelltypen 1 Woche nach I/R zeigen diese verminderte Aktivierung jedoch nicht, sodass weitere involvierte Zelltypen untersucht werden müssen. Zudem sollte eine genaue Analyse der intrazellulären RHAMM-Konzentration und der damit verbundenen ERK1/2-

Aktivierung nach I/R durchgeführt werden, da dieser Signalweg die Proliferation maßgeblich zu beeinflussen scheint.

4.4 Ausblick und Limitierung

In der Arbeitsgruppe konnte bereits festgestellt werden, dass die *Hmmr* OE zu einer signifikant verminderten Narbengröße im Vergleich zu WT-Mäusen führt. Dies deutet auf eine verbesserte Heilung und *Remodeling* nach I/R bei vermehrter HA/RHAMM-Signaltransduktion hin.

In der vorliegenden Arbeit sollten die daran beteiligten Zelltypen im Herzen untersucht werden. Die Analyse der Zellen wurde hauptsächlich durch immunohistochemische Färbungen durchgeführt. Es wäre sinnvoll alle Ergebnisse durch eine *realtime*-PCR zu ergänzen und zusätzlich noch eine Durchflusszytometrie durchzuführen. So können die histologischen Analysen überprüft und noch genauere Daten gewonnen werden.

Außerdem wurde die Zellkomposition, bis auf wenige Ausnahmen, zum Zeitpunkt 1 Woche nach I/R analysiert. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass die *Hmmr*-Expression nach kardialer Schädigung bei Zebrafischen an Tag 3 rapide ansteigt und an Tag 7 bereits wieder rückläufig ist [121]. Aus diesem Grund sollten die verschiedenen Zelltypen auch schon zu früheren Zeitpunkten, wie beispielsweise 24 h und 72 h nach I/R, untersucht werden. Diese Ergebnisse könnten weitere Aufschlüsse über die Wirkung der *Hmmr* OE bringen und dazu dienen die Ergebnisse 1 Woche nach I/R besser verstehen und interpretieren zu können.

Zudem sollten weitere Zelltypen, zusätzlich zu denen in dieser Arbeit untersuchten Zellen, analysiert werden. Bei *Has3* KO Mäusen konnte eine signifikante Abnahme der T-Lymphozyten nach I/R, durch eine verminderte Aktivierung und gesteigerte Apoptose, festgestellt werden [117]. Diese Analyse zeigt, dass HA auch auf Lymphozyten einen bedeutenden Einfluss hat. Die Untersuchung ob und inwiefern auch die RHAMM/HA-Interaktion bei der Aktivierung und Rekrutierung von Lymphozyten eine Rolle spielt würde sehr zum Verständnis der hier analysierten postischämischen Prozesse beitragen.

5 Literaturverzeichnis

1. Bundesamt, S., *Todesursachen in Deutschland*. Stand 12.09.2022.
2. Organization, W.H. *The top 10 causes of death*. 2020; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
3. Francula-Zaninovic, S. and I.A. Nola, *Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors*. Current Cardiology Reviews, 2018. **14**(3): p. 153-163.
4. Berry, J.D., et al., *Lifetime Risks of Cardiovascular Disease*. New England Journal of Medicine, 2012. **366**(4): p. 321-329.
5. Libby, P., et al., *Atherosclerosis*. Nature Reviews Disease Primers, 2019. **5**(1): p. 56.
6. Severino, P., et al., *Ischemic Heart Disease Pathophysiology Paradigms Overview: From Plaque Activation to Microvascular Dysfunction*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(21): p. 8118.
7. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-1136.
8. Hesse, M., A. Welz, and B.K. Fleischmann, *Heart regeneration and the cardiomyocyte cell cycle*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 2018. **470**(2): p. 241-248.
9. Payan, S.M., F. Hubert, and F. Rochais, *Cardiomyocyte proliferation, a target for cardiac regeneration*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020. **1867**(3): p. 118461.
10. Klocke, R., et al., *Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease*. Cardiovascular Research, 2007. **74**(1): p. 29-38.
11. Moran, A.E., et al., *The Global Burden of Ischemic Heart Disease in 1990 and 2010*. Circulation, 2014. **129**(14): p. 1493-1501.
12. Chapman, A.R., P.D. Adamson, and N.L. Mills, *Assessment and classification of patients with myocardial injury and infarction in clinical practice*. Heart, 2017. **103**(1): p. 10-18.
13. Thygesen, K., et al., *Universal definition of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(22): p. 2173-95.
14. Thygesen, K., et al., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)*. J Am Coll Cardiol, 2018. **72**(18): p. 2231-2264.
15. Vafaie, M., *State-of-the-art diagnosis of myocardial infarction*. Diagnosis (Berl), 2016. **3**(4): p. 137-142.
16. Adams, J.E., et al., *Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury*. Circulation, 1993. **88**(1): p. 101-106.
17. Pearlstone, J.R., M.R. Carpenter, and L.B. Smillie, *Amino acid sequence of rabbit cardiac troponin T*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(36): p. 16795-16810.
18. Morrow, D.A., et al., *National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical Characteristics and Utilization of Biochemical Markers in Acute Coronary Syndromes*. Circulation, 2007. **115**(13): p. e356-e375.
19. Katus, H.A., et al., *Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction*. Circulation, 1991. **83**(3): p. 902-912.

20. Mohammad, M.A., et al., *Predictive Value of High-Sensitivity Troponin T for Systolic Dysfunction and Infarct Size (Six Months) After ST-Elevation Myocardial Infarction*. The American Journal of Cardiology, 2018. **122**(5): p. 735-743.
21. Ricchiuti, V., et al., *Cardiac Troponin I and T Alterations in Dog Hearts With Myocardial Infarction: Correlation With Infarct Size*. American Journal of Clinical Pathology, 1998. **110**(2): p. 241-247.
22. Bentzon, J.F., et al., *Mechanisms of Plaque Formation and Rupture*. Circulation Research, 2014. **114**(12): p. 1852-1866.
23. Sandoval, Y. and A.S. Jaffe, *Type 2 Myocardial Infarction*. Journal of the American College of Cardiology, 2019. **73**(14): p. 1846-1860.
24. Cohen, M. and G. Visveswaran, *Defining and managing patients with non-ST-elevation myocardial infarction: Sorting through type 1 vs other types*. Clinical Cardiology, 2020. **43**(3): p. 242-250.
25. Miha Tibaut, D.M., Daniel Petrovič, *Pathophysiology of Myocardial Infarction and Acute Management Strategies*. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry, 2016.
26. Jennings, R.B. and K.A. Reimer, *The Cell Biology of Acute Myocardial Ischemia*. Annual Review of Medicine, 1991. **42**(1): p. 225-246.
27. Reimer, K.A. and R.B. Jennings, *The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow*. Lab Invest, 1979. **40**(6): p. 633-44.
28. Harden, W.R., et al., *Temporal relation between onset of cell anoxia and ischemic contractile failure*. The American Journal of Cardiology, 1979. **44**(4): p. 741-746.
29. Jennings, R.B., et al., *Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo*. Circulation Research, 1981. **49**(4): p. 892-900.
30. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction*. Circulation Research, 2016. **119**(1): p. 91-112.
31. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair*. Circulation Research, 2012. **110**(1): p. 159-173.
32. Newton, K. and V.M. Dixit, *Signaling in Innate Immunity and Inflammation*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012. **4**(3): p. a006049-a006049.
33. Mann, D.L., *The Emerging Role of Innate Immunity in the Heart and Vascular System*. Circulation Research, 2011. **108**(9): p. 1133-1145.
34. De Haan, J.J., et al., *Danger Signals in the Initiation of the Inflammatory Response after Myocardial Infarction*. Mediators of Inflammation, 2013. **2013**: p. 1-13.
35. Scheibner, K.A., et al., *Hyaluronan Fragments Act as an Endogenous Danger Signal by Engaging TLR2*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(2): p. 1272-1281.
36. Chandrasekar, B., J.B. Smith, and G.L. Freeman, *Ischemia-Reperfusion of Rat Myocardium Activates Nuclear Factor- κ B and Induces Neutrophil Infiltration Via Lipopolysaccharide-Induced CXC Chemokine*. Circulation, 2001. **103**(18): p. 2296-2302.

37. Kologrivova, I., et al., *Cells of the Immune System in Cardiac Remodeling: Main Players in Resolution of Inflammation and Repair After Myocardial Infarction*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 664457.
38. Ridker, P.M. and T.F. Luscher, *Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease*. *European Heart Journal*, 2014. **35**(27): p. 1782-1791.
39. Wang, X., et al., *Inflammation, Autophagy, and Apoptosis After Myocardial Infarction*. *Journal of the American Heart Association*, 2018. **7**(9).
40. Ma, Y., A. Yabluchanskiy, and M.L. Lindsey, *Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction*. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2013. **6**(1): p. 11.
41. Weyrich, A.S., et al., *In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury*. *Journal of Clinical Investigation*, 1993. **91**(6): p. 2620-2629.
42. Borregaard, N., *Neutrophils, from Marrow to Microbes*. *Immunity*, 2010. **33**(5): p. 657-670.
43. Hoyer, F.F. and M. Nahrendorf, *Neutrophil contributions to ischaemic heart disease*. *European Heart Journal*, 2017. **38**(7): p. 465-472.
44. Mangold, A., et al., *Neutrophil extracellular traps and monocyte subsets at the culprit lesion site of myocardial infarction patients*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1).
45. Ge, L., et al., *Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow: therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015. **308**(5): p. H500-9.
46. Dewald, O., et al., *Of Mice and Dogs*. *The American Journal of Pathology*, 2004. **164**(2): p. 665-677.
47. Bournazou, I., et al., *Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin*. *Journal of Clinical Investigation*, 2008.
48. Soehnlein, O. and L. Lindbom, *Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(6): p. 427-39.
49. Jolly, S.R., et al., *Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: Effect of duration of occlusion*. *American Heart Journal*, 1986. **112**(4): p. 682-690.
50. Horckmans, M., et al., *Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype*. *European Heart Journal*, 2016: p. ehw002.
51. Jung, K., et al., *Endoscopic Time-Lapse Imaging of Immune Cells in Infarcted Mouse Hearts*. *Circulation Research*, 2013. **112**(6): p. 891-899.
52. Kintscher, U., et al., *Angiotensin II Induces Migration and Pyk2/Paxillin Phosphorylation of Human Monocytes*. *Hypertension*, 2001. **37**(2): p. 587-593.
53. Dutta, P. and M. Nahrendorf, *Monocytes in Myocardial Infarction*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2015. **35**(5): p. 1066-1070.
54. Swirski, F.K., et al., *Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites*. *Science*, 2009. **325**(5940): p. 612-616.
55. Dick, S.A., et al., *Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction*. *Nature Immunology*, 2019. **20**(1): p. 29-39.

56. Nahrendorf, M. and F.K. Swirski, *Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function*. *Circulation Research*, 2016. **119**(3): p. 414-417.
57. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties*. *Immunity*, 2003. **19**(1): p. 71-82.
58. Nahrendorf, M., M.J. Pittet, and F.K. Swirski, *Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair After Myocardial Infarction*. *Circulation*, 2010. **121**(22): p. 2437-2445.
59. Leo, et al., *Nr4a1-Dependent Ly6Clow Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal*. *Cell*, 2013. **153**(2): p. 362-375.
60. Auffray, C., et al., *Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior*. *Science*, 2007. **317**(5838): p. 666-70.
61. Peet, C., et al., *Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction*. *Cardiovascular Research*, 2020. **116**(6): p. 1101-1112.
62. Bajpai, G., et al., *The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions*. *Nat Med*, 2018. **24**(8): p. 1234-1245.
63. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm*. *The Journal of Immunology*, 2000. **164**(12): p. 6166-6173.
64. Sica, A., et al., *Macrophage polarization in pathology*. *Cell Mol Life Sci*, 2015. **72**(21): p. 4111-26.
65. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. *Journal of Experimental Medicine*, 2007. **204**(12): p. 3037-3047.
66. Aurora, A.B., et al., *Macrophages are required for neonatal heart regeneration*. *Journal of Clinical Investigation*, 2014. **124**(3): p. 1382-1392.
67. Maekawa, Y., et al., *Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **39**(2): p. 241-6.
68. Hofmann, U. and S. Frantz, *Role of Lymphocytes in Myocardial Injury, Healing, and Remodeling After Myocardial Infarction*. *Circulation Research*, 2015. **116**(2): p. 354-367.
69. Rochman, Y., R. Spolski, and W.J. Leonard, *New insights into the regulation of T cells by γ c family cytokines*. *Nature Reviews Immunology*, 2009. **9**(7): p. 480-490.
70. Hofmann, U. and S. Frantz, *Role of T-cells in myocardial infarction*. *European Heart Journal*, 2016. **37**(11): p. 873-879.
71. Lai, S.-L., R. Marín-Juez, and D.Y.R. Stainier, *Immune responses in cardiac repair and regeneration: a comparative point of view*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019. **76**(7): p. 1365-1380.
72. Zougari, Y., et al., *Regulatory T Cells Modulate Postischemic Neovascularization*. *Circulation*, 2009. **120**(14): p. 1415-1425.
73. Yang, Z., et al., *Myocardial Infarct-Sparing Effect of Adenosine A_{2A} Receptor Activation Is due to Its Action on CD4⁺ T Lymphocytes*. *Circulation*, 2006. **114**(19): p. 2056-2064.
74. Zougari, Y., et al., *B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction*. *Nature Medicine*, 2013. **19**(10): p. 1273-1280.
75. Shinde, A.V. and N.G. Frangogiannis, *Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2014. **70**: p. 74-82.

76. Turner, N.A., *Inflammatory and fibrotic responses of cardiac fibroblasts to myocardial damage associated molecular patterns (DAMPs)*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2016. **94**: p. 189-200.
77. Desmoulière, A., et al., *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts*. Journal of Cell Biology, 1993. **122**(1): p. 103-111.
78. Wang, J., et al., *Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(5): p. H1871-81.
79. Clark, D.A. and R. Coker, *Transforming growth factor-beta (TGF-beta)*. Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(3): p. 293-8.
80. Fu, X., et al., *Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart*. Journal of Clinical Investigation, 2018. **128**(5): p. 2127-2143.
81. Kanisicak, O., et al., *Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart*. Nature Communications, 2016. **7**(1): p. 12260.
82. Snider, P., et al., *Origin of Cardiac Fibroblasts and the Role of Periostin*. Circulation Research, 2009. **105**(10): p. 934-947.
83. Shimazaki, M., et al., *Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction*. Journal of Experimental Medicine, 2008. **205**(2): p. 295-303.
84. Camenisch, T.D., et al., *Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme*. Journal of Clinical Investigation, 2000. **106**(3): p. 349-360.
85. Hascall, V.C., et al., *The dynamic metabolism of hyaluronan regulates the cytosolic concentration of UDP-GlcNAc*. Matrix Biol, 2014. **35**: p. 14-7.
86. Liang, J., D. Jiang, and P.W. Noble, *Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **97**: p. 186-203.
87. Fraser, J.R.E., T.C. Laurent, and U.B.G. Laurent, *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*. Journal of Internal Medicine, 1997. **242**(1): p. 27-33.
88. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 221-64.
89. Stern, R., A.A. Asari, and K.N. Sugahara, *Hyaluronan fragments: an information-rich system*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(8): p. 699-715.
90. Hunger, J., et al., *Hydration Dynamics of Hyaluronan and Dextran*. Biophysical Journal, 2012. **103**(1): p. L10-L12.
91. Powell, J.D. and M.R. Horton, *Threat Matrix: Low-Molecular-Weight Hyaluronan (HA) as a Danger Signal*. Immunologic Research, 2005. **31**(3): p. 207-218.
92. Petrey, A.C. and C.A. De La Motte, *Hyaluronan in inflammatory bowel disease: Cross-linking inflammation and coagulation*. Matrix Biology, 2019. **78-79**: p. 314-323.
93. Itano, N., et al., *Three Isoforms of Mammalian Hyaluronan Synthases Have Distinct Enzymatic Properties*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(35): p. 25085-25092.
94. Tammi, R.H., et al., *Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis*. FEBS Journal, 2011. **278**(9): p. 1419-1428.

95. Sugiyama, Y., et al., *Putative Hyaluronan Synthase mRNA Are Expressed in Mouse Skin and TGF- β Upregulates Their Expression in Cultured Human Skin Cells*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1998. **110**(2): p. 116-121.
96. Csoka, A.B., G.I. Frost, and R. Stern, *The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes*. *Matrix Biol*, 2001. **20**(8): p. 499-508.
97. Chowdhury, B., et al., *Murine Hyaluronidase 2 Deficiency Results in Extracellular Hyaluronan Accumulation and Severe Cardiopulmonary Dysfunction*. *Journal of Biological Chemistry*, 2013. **288**(1): p. 520-528.
98. Yoshida, H. and Y. Okada, *Role of HYBID (Hyaluronan Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization), Alias KIAA1199/CEMIP, in Hyaluronan Degradation in Normal and Photoaged Skin*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. **20**(22): p. 5804.
99. Li, L., et al., *Central Role of CEMIP in Tumorigenesis and Its Potential as Therapeutic Target*. *Journal of Cancer*, 2017. **8**(12): p. 2238-2246.
100. Aruffo, A., et al., *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate*. *Cell*, 1990. **61**(7): p. 1303-13.
101. Sherman, L., et al., *Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression*. *Curr Opin Cell Biol*, 1994. **6**(5): p. 726-33.
102. McDonald, B. and P. Kubes, *Interactions between CD44 and Hyaluronan in Leukocyte Trafficking*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 68.
103. Banerji, S., et al., *LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-specific Receptor for Hyaluronan*. *Journal of Cell Biology*, 1999. **144**(4): p. 789-801.
104. Harris, E.N., J.A. Weigel, and P.H. Weigel, *The Human Hyaluronan Receptor for Endocytosis (HARE/Stabilin-2) Is a Systemic Clearance Receptor for Heparin*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(25): p. 17341-17350.
105. Yamaguchi, Y., *Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix*. *Cell Mol Life Sci*, 2000. **57**(2): p. 276-89.
106. Savani, R.C., et al., *Migration of bovine aortic smooth muscle cells after wounding injury. The role of hyaluronan and RHAMM*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(3): p. 1158-68.
107. Turley, E.A., P.W. Noble, and L.Y.W. Bourguignon, *Signaling Properties of Hyaluronan Receptors*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(7): p. 4589-4592.
108. Choi, S., et al., *Function and clinical relevance of RHAMM isoforms in pancreatic tumor progression*. *Molecular Cancer*, 2019. **18**(1).
109. Messam, B.J., et al., *RHAMM Is a Multifunctional Protein That Regulates Cancer Progression*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. **22**(19): p. 10313.
110. Maxwell, C.A., J. McCarthy, and E. Turley, *Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions?* *Journal of Cell Science*, 2008. **121**(7): p. 925-932.
111. Misra, S., et al., *Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 201.
112. Yang, B., et al., *Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein*. *The EMBO Journal*, 1994. **13**(2): p. 286-296.

113. Cui, Z., et al., *The Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility (CD168) promotes inflammation and fibrosis after acute lung injury*. *Matrix Biol*, 2019. **78-79**: p. 255-271.
114. Schatz-Siemers, N., et al., *Expression of the Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility (RHAMM) in Endometrial Cancer is Associated With Adverse Histologic Parameters and Tumor Progression*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2020. **28**(6): p. 453-459.
115. Nedvetzki, S., et al., *RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: A different interpretation of redundancy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. **101**(52): p. 18081-18086.
116. Petz, A., et al., *Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury*. *Circ Res*, 2019. **124**(10): p. 1433-1447.
117. Piroth, M., et al., *Hyaluronan Synthase 3 is Protective After Cardiac Ischemia-Reperfusion by preserving the T cell Response*. *Matrix Biol*, 2022.
118. Huebener, P., et al., *CD44 Is Critically Involved in Infarct Healing by Regulating the Inflammatory and Fibrotic Response*. *The Journal of Immunology*, 2008. **180**(4): p. 2625-2633.
119. Dorsey, S.M., et al., *MRI evaluation of injectable hyaluronic acid-based hydrogel therapy to limit ventricular remodeling after myocardial infarction*. *Biomaterials*, 2015. **69**: p. 65-75.
120. Abdalla, S., et al., *Hyaluronic acid-based hydrogel induces neovascularization and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction*. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 2013. **17**(5): p. 767-772.
121. Missinato, M.A., et al., *Extracellular component hyaluronic acid and its receptor Hmmer are required for epicardial EMT during heart regeneration*. *Cardiovascular Research*, 2015. **107**(4): p. 487-498.
122. Jaskuła, K., et al., *Cardiovascular Effects Mediated by HMMR and CD44*. *Mediators of Inflammation*, 2021. **2021**: p. 1-9.
123. Carol-Ann Eberle, genOway, *Development of a Cre-inducible Rhamm overexpressing mouse model using the Rosa26 Quick Knock-in™ technology*. 2018.
124. Soriano, P., *Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain*. *Nature Genetics*, 1999. **21**(1): p. 70-71.
125. Chaudhry, S.I., et al., *National Trends in Recurrent AMI Hospitalizations 1 Year After Acute Myocardial Infarction in Medicare Beneficiaries: 1999–2010*. *Journal of the American Heart Association*, 2014. **3**(5): p. e001197-e001197.
126. De Luca, L., et al., *Incidence, Characteristics, and Management of Patients with Recurrent Myocardial Infarctions: Insights from the EYESHOT POST-MI*. *Journal of Interventional Cardiology*, 2022. **2022**: p. 1-8.
127. Collet, J.P., et al., *2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation*. *Eur Heart J*, 2021. **42**(14): p. 1289-1367.
128. e.V., D.G.f.K.H.-u.K., (2018) *ESC Pocket Guidelines. Therapie des akuten Herzinfarktes bei Patienten mit ST-Streckenhebung (STEMI)*, Version 2017. Börm Bruckmeier Verlag GmbH, Grünwald

- Kurzfassung der „ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation“ (European Heart Journal; 2018 - doi/10.1093/eurheartj/ehx393). 2017.
129. Swaroop, G., *Post-myocardial Infarction Heart Failure: A Review on Management of Drug Therapies*. Cureus, 2022.
 130. Ruparelia, N., et al., *Inflammatory processes in cardiovascular disease: a route to targeted therapies*. Nature Reviews Cardiology, 2017. **14**(3): p. 133-144.
 131. Menko, A.S., A. Romisher, and J.L. Walker, *The Pro-fibrotic Response of Mesenchymal Leader Cells to Lens Wounding Involves Hyaluronic Acid, Its Receptor RHAMM, and Vimentin*. Front Cell Dev Biol, 2022. **10**: p. 862423.
 132. Walker, J.L., et al., *In wound repair vimentin mediates the transition of mesenchymal leader cells to a myofibroblast phenotype*. Molecular Biology of the Cell, 2018. **29**(13): p. 1555-1570.
 133. Tolg, C., et al., *Cell-specific expression of the transcriptional regulator RHAMM provides a timing mechanism that controls appropriate wound re-epithelialization*. Journal of Biological Chemistry, 2020. **295**(16): p. 5427-5448.
 134. Savani, R.C., et al., *Differential Involvement of the Hyaluronan (HA) Receptors CD44 and Receptor for HA-mediated Motility in Endothelial Cell Function and Angiogenesis*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(39): p. 36770-36778.
 135. Park, D., et al., *Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGF β receptor interaction via CD44-PKC δ* . Molecules and Cells, 2012. **33**(6): p. 563-574.
 136. Zaman, A., et al., *Expression and Role of the Hyaluronan Receptor RHAMM in Inflammation after Bleomycin Injury*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2005. **33**(5): p. 447-454.
 137. Johnson, P., et al., *Hyaluronan and Its Interactions With Immune Cells in the Healthy and Inflamed Lung*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2787.
 138. Song, J.M., et al., *Hyaluronan-CD44/RHAMM interaction-dependent cell proliferation and survival in lung cancer cells*. Mol Carcinog, 2019. **58**(3): p. 321-333.
 139. Hatano, H., et al., *Overexpression of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in MC3T3-E1 cells induces proliferation and differentiation through phosphorylation of ERK1/2*. J Bone Miner Metab, 2012. **30**(3): p. 293-303.
 140. Leng, Y., et al., *Hyaluronic acid, CD44 and RHAMM regulate myoblast behavior during embryogenesis*. Matrix Biology, 2019. **78-79**: p. 236-254.

6 Danksagung

Zunächst möchte ich mich gerne bei Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit unter seiner Leitung durchführen zu können. Die regelmäßigen Meetings in der Arbeitsgruppe haben stets neue Denkanstöße gegeben und sehr zum Fortschritt meiner Arbeit beigetragen. Zudem habe ich mich gefreut Teil des Sonderforschungsbereichs 1116 gewesen sein zu können. Es war sehr spannend weitere intensive Einblicke in die Forschung zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu bekommen. Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Anne Petz, die mich in allen Phasen meiner Promotion sehr gut betreut hat. Vielen Dank für die enge Zusammenarbeit und die Bereitschaft mir jederzeit mit allen Fragestellungen geholfen zu haben. Durch die gute Kommunikation hat mir das gemeinsame Arbeiten sehr viel Spaß gemacht.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität für das freundliche Miteinander und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders danke ich Annika Zimmermann und Peggy Marra-Mann, die mir im Labor stets eine große Hilfe waren.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Daniel Gorski und Dr. Marco Piroth für die gute Zusammenarbeit und große Hilfsbereitschaft bedanken.

Dr. Simone Gorressen danke ich für die operative Durchführung der Ischämie und Reperfusion. Ohne diese Hilfe wären die Experimente so nicht möglich gewesen.

Der größte Dank geht an meine Familie und Christopher, da sie immer für mich da sind und mich in dieser Zeit sehr unterstützt haben. Ich bin euch sehr dankbar, dass ihr jederzeit ein offenes Ohr für mich habt und mir immer den Rücken stärkt.