

Bedeutung des Rezeptors RHAMM (*Receptor for Hyaluronan Mediated Motility*) für die Heilung nach kardialer Ischämie und Reperfusion

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Angelika Juliette Pastuschka

aus Goch

Düsseldorf, September 2024

aus dem Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2025

Isabella und Paul

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung.....	1
1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen als führende Todesursache in Deutschland	1
1.2 Der Myokardinfarkt	2
1.2.1 Die Kardiomyozyten.....	4
1.2.2 Die Entzündungsreaktion.....	6
1.2.2.1 Neutrophilen Granulozyten	6
1.2.2.3 Lymphozyten	7
1.2.3 Die Rolle der Fibroblasten	7
1.3 Das Hyaluronsäuresystem.....	10
1.3.1 Die Hyaluronsäure	10
1.3.2 Die Synthese der Hyaluronsäure.....	12
1.3.3 Zielstrukturen innerhalb der Hyaluronsäure-haltigen Matrix	13
1.3.3.1 RHAMM – ein Rezeptor für die Hyaluronsäure-vermittelte Motilität	13
1.3.4 Abbau der Hyaluronsäure	16
1.3.5 Hyaluronsäure und Entzündung	17
1.3.6 Hyaluronsäure und Fibroblasten.....	18
1.4 Zielsetzung	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Tierversuche	21
2.1.1 Tierhaltung.....	21
2.1.2 Mauslinien.....	21
2.1.3 Induktion der Ischämie und Reperfusion	22
2.1.4 Echokardiografie	25
2.2 Validierung der <i>Hmmr</i> Überexpression bzw. des <i>Knockouts</i>	25
2.2.1 Herstellung der linksventrikulären Herz-Homogenate	26
2.2.2 Proteindetektion mittels Western-Blot (Immunoblot)	26
2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Methode.....	27
2.3 Infarktgrößenbestimmung mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)- Färbung.....	28
2.4 Passive Kraftmessung an isolierten Kardiomyozyten.....	29
2.5 Durchflusszytometrie	30
2.5.1 Blut.....	31
2.5.2 Milz	31
2.5.3 Knochenmark.....	32
2.5.4 Herz	33

2.6	Organentnahme sowie Histologische und Immunhistochemische Analysen.....	33
2.6.1	Gomori-Trichrom Färbung	36
2.6.2	Picro-Siriusrot Färbung.....	36
2.6.3	Immunhistochemische Färbungen.....	37
2.6.3.1	Kollagen VA1-Färbung	37
2.6.3.2	Kollagen VIA1-Färbung	37
2.6.3.6	CD68-Färbung zur Detektion von Makrophagen	38
2.6.3.7	Färbung des Matrixproteins Decorin.....	38
2.6.3.8	Anfärbung des <i>Cartilage oligomeric matrix protein</i> (COMP).....	38
2.6.3.9	Hyaluronsäure-Färbung.....	38
2.7	Statistische Analysen.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Validierung der Mausmodelle mittels Western Blot	40
3.2	Auswertung der Herzgewichte.....	40
3.3	Echokardiografische Untersuchung der Herzfunktion	40
3.4	TTC.....	42
3.5	Histologische Ermittlung der Narbengröße und des Kollagengehalts	43
3.6	<i>Stiffness</i>	51
3.7	Immunfärbungen.....	52
3.7.1	Der Einfluss von RHAMM auf weitere Kollagene	52
3.7.2	Der Einfluss von RHAMM auf die postischämische Entzündung	56
3.7.3	Der Einfluss von RHAMM auf die postischämische EZM Organisation.....	57
3.8	Einfluss der Überexpression von RHAMM auf die Immunantwort.....	73
	72 Stunden nach I/R.....	73
3.8.1	Blut.....	73
3.8.2	Milz	74
3.8.3	Herz	75
3.9	Knochenmark.....	75
4	Diskussion.....	77
4.1	Auswirkung der RHAMM-Überexpression auf die Herzfunktion nach I/R.....	78
4.2	Die Rolle von RHAMM in der kardialen Fibrose	78
4.3	RHAMM beschleunigt die Fibroblastenreifung	79
4.4	COMP-Akkumulation in den <i>Hmmr</i> -OE Mäusen	80
4.5	Weniger HA in <i>Hmmr</i> -OE Mäusen 1 Woche nach I/R	82
4.6	Vermehrte Expression von Dermatotontin in den <i>Hmmr</i> -OE Mäusen	82
4.7	Zusammenhang zwischen erhöhter Dermatotontin Synthese und vermindertem Hyaluronsäuregehalt der <i>Hmmr</i> -OE Mäuse	85
4.8	Limitierung und Schlussfolgerung.....	84

5	Zusammenfassung	85
6	Summary	88
7	Appendix	89
8	Abbildungsverzeichnis	91
9	Tabellenverzeichnis	93
10	Abkürzungsverzeichnis	94
11	Literaturverzeichnis	99
12	Posterpräsentation	113
13	Lebenslauf	114
14	Danksagung	115
15	Eidesstattliche Versicherung	116

1. Einleitung

1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen als führende Todesursache in Deutschland

Bereits seit 1905 werden einheitlich die Todesursachen in und für Deutschland dokumentiert. Grundlage dafür sind die Todesbescheinigungen, welche gesammelt von den Gesundheitsämtern an das statistische Bundesamt übermittelt werden. Darin erfasst werden die Todesursache und auch Begleiterkrankungen. Ausschlaggebend für das statistische Bundesamt ist dabei das Grundleiden, welches zum Tode geführt hat, die sogenannte „monokausale Aufbereitung“. Jedes Jahr werden so die Todesursachen gemäß dem ICD-Code veröffentlicht und sind für alle Bürger einsehbar. Vor allem für die Wissenschaft und Medizin ergeben sich daraus Möglichkeiten so die Lebenserwartung und auch die Lebensqualität der Bürger zu erhöhen bzw. zu verbessern¹.

Für das Jahr 2023 registrierte das Statistische Bundesamt in Deutschland insgesamt 1.028.206 Todesfälle. Darunter waren Krankheiten des Kreislaufsystems mit 348.312 Fällen (33,9 %) die häufigste Todesursache, wobei insgesamt mehr Frauen als Männer betroffen waren². Neubildungen waren für 238.622 Todesfälle (23,2%) verantwortlich und lagen damit an zweiter Stelle. An dritter Stelle stehen Krankheiten des Atmungssystems mit 72.502 Sterbefällen (7,1%)² (Abbildung 1).

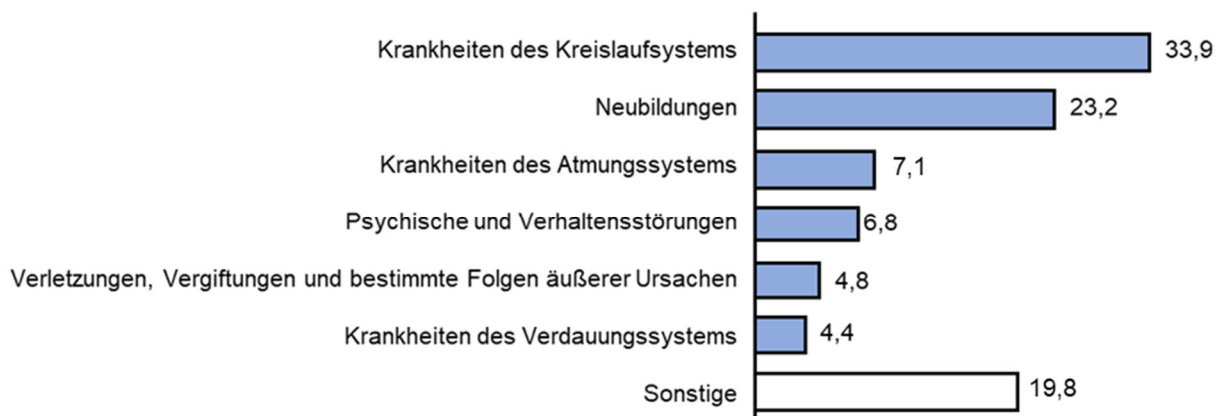


Abbildung 1: Die häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahre 2023 (modifiziert nach ²)

Eine genauere Betrachtung der Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Jahr 2023 zeigt eine Dominanz der ischämischen Krankheitsbilder. Die chronische ischämische Herzkrankheit verursachte 74.415 Sterbefälle (21,4%), gefolgt vom akuten Myokardinfarkt mit 43.839 Fällen (12,6%) und der Herzinsuffizienz mit 37.645 Sterbefällen (10,8%). Diese stellt eine häufige und auch typische Folge eines Herzinfarktes dar³. Auch die hypertensive Herzkrankheit und das Vorhofflattern/Vorhofflimmern spielen mit 24.207 Sterbefällen (6,9 %) bzw. 23.469 Sterbefällen (6,7 %) eine wichtige Rolle und gelten als typische Risikofaktoren zur Entstehung eines Myokardinfarktes⁴ (Abbildung 2).

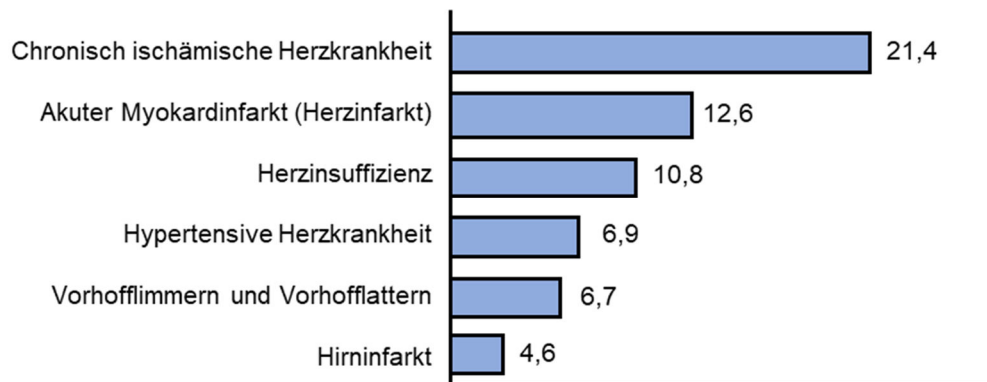


Abbildung 2: Die häufigsten kardiovaskulären Todesursachen in Deutschland im Jahre 2023 (modifiziert nach ⁴⁾)

Neben den bereits genannten Risikofaktoren gibt es noch weitere Faktoren, die eine Rolle bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und deren Folgeerkrankungen spielen. Diese lassen sich in beeinflussbare und nicht beeinflussbare Faktoren gliedern. Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren zählen beispielsweise Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum, ein inaktiver Lebensstil, Stress oder auch die Entwicklung eines metabolischen Syndroms mit Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2), Übergewicht und Hypercholesterinämie. Zu den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren zählen beispielsweise das Alter, das Vorliegen eines PCOS⁵ bei Frauen sowie vor allem auch die genetische Veranlagung⁶⁻⁸. Zusammen können diese Faktoren das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen beeinflussen und spielen eine maßgebliche Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten der Erkrankung⁶. Daher ist es wichtig, sowohl die beeinflussbaren als auch die nicht beeinflussbaren Risikofaktoren bei der Prävention und Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu berücksichtigen.

Ein Problem, das sich durch die Pathogenese der Herz-Kreislauf-Erkrankungen ergibt, ist, dass diese erst spät erkannt und diagnostiziert werden. Dadurch bedingt erfolgt meist nur eine symptomatische Therapie und das Fortschreiten kann oftmals nur noch verlangsamt, aber keinesfalls gestoppt werden. Zusammen mit dem zunehmend ungesunden Lebensstil wird daher damit gerechnet, dass Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems auch zukünftig die Todesursache Nummer eins in Deutschland bleiben werden⁹. Aus diesem Grund ist die Klinische, aber auch die Grundlagenforschung in diesem Bereich so essenziell. Vor allem die Forschung bezüglich einer pharmakotherapeutischen Intervention zur Minimierung der Auswirkungen eines akuten Myokardinfarktes birgt die Hoffnung, den Gesundheitszustand vieler Menschen zu verbessern⁹.

1.2 Der Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt, auch als Herzinfarkt bekannt, ist ein medizinischer Notfall, der auftritt, wenn ein Teil des Herzmuskels (Myokard) nicht ausreichend mit nährstoff- und sauerstoffreichem Blut versorgt wird¹⁰. Dies geschieht in der Regel durch eine plötzliche

Blockade oder Verengung einer oder mehrerer Koronararterien, welche sauerstoffreiches Blut zum Herzmuskel transportieren¹¹. Die Hauptursache dafür ist meist die Bildung eines Blutgerinnsels (Thrombus) in einer bereits durch Arteriosklerose verengten oder geschädigten Koronararterie oder aber die Ruptur atherosklerotischer Plaques. Dies führt dazu, dass der Blutfluss zum Herzmuskel teilweise oder vollständig unterbrochen wird, was zu einem Sauerstoffmangel im betroffenen Bereich führt^{11,12}. Ohne ausreichende Sauerstoffzufuhr beginnt der Herzmuskel abzusterben, was zu Schäden und möglicherweise zum Versagen des Herzmuskels führen kann. Eine Herzinsuffizienz³ oder auch eine gestörte Reizweiterleitung können die Folge sein, die u.a. in Arrhythmien¹³ münden können.

Klinisch ist dieser Myokardinfarkt durch eine abnorme Erhöhung kardialer Biomarker gekennzeichnet¹⁴⁻¹⁶. Einer der wichtigsten ist das Troponin, ein Protein, das im Herzmuskel, aber auch in anderen Geweben vorkommt¹⁴⁻¹⁶. Troponin ist Teil des kontraktiles Apparates von Muskelzellen und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Muskelkontraktion^{11,17,18}. Chemisch betrachtet besteht Troponin aus 3 Untereinheiten, die aus verschiedenen Aminosäuren zusammengesetzt sind. Diese Untereinheiten haben spezifische Bindungsstellen für Calcium-Ionen und andere Proteine, die physiologisch an dem Kontraktionsmechanismus des Myokards beteiligt sind¹¹. Es kommt endogen in drei Isoformen vor: Troponin C, Troponin I und Troponin T, wobei die beiden Letzteren fast ausschließlich im Herzen exprimiert werden^{11,17,18}. Im Zuge eines Myokardinfarktes sterben Kardiomyozyten ab, wodurch Troponin aus den Zellen freigesetzt wird und in den Blutkreislauf (Zirkulation) gelangt^{17,18}. Die Messung des Troponinspiegels im Blut ist ein wichtiger diagnostischer Marker für einen Myokardinfarkt. Wenn der Wert über der 99. Perzentile liegt und weiter ansteigt oder fällt, deutet dies auf eine akute Myokardschädigung hin. Wenn die Werte stagnieren, liegt eine chronische Schädigung des Myokards vor¹¹. Es ist wichtig zu beachten, dass es auch andere Erkrankungen gibt, bei denen das Myokard geschädigt wird und hohe cTn-Werte vorliegen, die jedoch nicht auf eine Ischämie oder einen Myokardinfarkt zurückzuführen sind. Ein Beispiel dafür ist eine Myokarditis. Aber auch eine Sepsis, eine chronische Nierenerkrankung oder Sarkoidose können zu erhöhten Troponin-Werten führen¹¹. Ein tatsächlicher Myokardinfarkt muss daher durch eine weitere Methode bestätigt werden. Zur Untersuchung bedient man sich in der Regel der Echokardiografie (EKG) oder der Angiografie^{11,19}. Insgesamt werden klinisch 5 Typen des Myokardinfarktes unterschieden: Typ 1 – Auslöser ist das Aufbrechen einer atherosklerotischen Plaqueruptur mit Entstehung eines (nicht)okkludierenden Thrombus; Typ 2 – Auslöser ist hier das Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot- und -bedarf, bspw. durch Atherosklerose, Vasospasmen oder koronare mikrovaskuläre Dysfunktion; Typ 3 – Kardiale Todesursache unbekannten Ursprungs, Todeseintritt vor Biomarkerbestimmung; Typ 4a – Auslöser während einer perkutanen koronaren Intervention (PCI), wobei die Diagnose hier kompliziert ist; Typ 4b – Auslöser hier assoziiert mit einer Stent/Scaffold Thrombose; Typ 5 – Myokardinfarkt nach erfolgter Bypass OP, unter 48 Stunden nach Intervention^{11,19,20}.

Die Symptome eines Myokardinfarktes können plötzlich auftreten und umfassen typischerweise starke Schmerzen oder ein Druckgefühl in der Brust, Schmerzen, die in den Arm, den Rücken, den Nacken, den Kiefer oder den Oberbauch ausstrahlen können, Atemnot, Übelkeit, Erbrechen, Schwindel und Schwächegefühl²¹. Beachtet werden sollte, dass diese Symptome bei Frauen teilweise fehlen oder schwach ausgeprägt sein können, was zu Fehlinterpretationen führen kann²¹. Ein Myokardinfarkt erfordert immer eine sofortige medizinische Behandlung, um den Blutfluss zum Herzmuskel wiederherzustellen und den Schaden am Herzmuskel so minimieren zu können. Die Behandlung kann Medikamente, Katheterverfahren wie die PCI oder in schwerwiegenden Fällen eine Koronararterien-Bypass-Operation umfassen¹¹. Eine frühzeitige Erkennung von Risikofaktoren und die Umsetzung eines gesunden Lebensstils können dazu beitragen, das Risiko für einen Myokardinfarkt zu verringern⁹. Da es im Zuge eines Myokardinfarktes auch zu fibrotischen Veränderungen des Herzmuskels kommt, was eine Veränderung in der Funktionsweise des Herzmuskels bedingt, ist die Forschung in diesem Bereich unerlässlich. Hier gibt es bereits erste Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, jedoch bedarf es noch einer erheblichen Forschungsarbeit therapeutische Ziele zu identifizieren, um den Umbau der kardialen Matrix positiv beeinflussen zu können^{9,22}.

1.2.1 Die Kardiomyozyten

Wie bereits oben beschrieben, stellt ein Myokardinfarkt einen medizinischen Notfall dar und bedarf einer sofortigen Intervention, um die Schäden am Myokard möglichst klein zu halten. Bereits wenige Sekunden nach Unterbindung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung werden komplexe pathophysiologische Prozesse in Gang gesetzt und initiieren das irreversible Absterben der Kardiomyozyten im betroffenen Areal sowie den Beginn einer Entzündungsreaktion²³. Durch den Verlust dieser Herzmuskelzellen erleidet das Myokard Veränderungen in seiner strukturellen und funktionellen Integrität^{3,13}. Das Absterben der Zellen erfolgt dabei durch verschiedene Mechanismen, wobei Nekrose und Apoptose in komplexer Weise miteinander interagieren.

Unter physiologischen und damit aeroben Bedingungen erfolgt die Energiegewinnung des Herzens durch ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren. In Anbetracht der essenziellen Bedeutung eines funktionierenden Myokards ist die Energiegewinnung nicht auf einen einzigen Stoffwechselweg beschränkt. Insbesondere die β -Oxidation freier Fettsäuren, aber auch die Glykolyse sowie die Gewinnung von Guanosintriphosphat (GTP) aus dem Citratzyklus stellen essenzielle Energielieferanten der Kardiomyozyten dar²⁴. Kommt es jedoch zu hypoxischen Bedingungen in einem Bereich des Myokards, so resultiert dies in einer *Dysbalance* des Energiestoffwechsels. Durch eine beeinträchtigte β -Oxidation der Fettsäuren kommt es in der Folge zu einer Verschiebung des physiologischen Gleichgewichts zwischen Nicotinamadenindinukleotid (NADH) hin zu NAD^+ und von Flavinadenindinukleotid (FAD) hin zu FADH_2 ²⁵. Des Weiteren kommt es zu einer Einschränkung der oxidativen Phosphorylierung

in den Mitochondrien. Unter physiologischen Bedingungen kann auf diesem Wege ATP generiert werden, welches dem Herzmuskel als Energielieferant zur Verfügung gestellt wird. Unter anaeroben Bedingungen hingegen ist die adäquate Phosphorylierung nun nicht mehr gewährleistet, was zu einem ATP-Mangel führt. Stattdessen bedient sich der Herzmuskel nun der anaeroben Glykolyse, welche jedoch keinesfalls den Energiebedarf des Herzens decken kann. Deshalb kommt es zu einer Verminderung der kontraktilen Integrität des Herzmuskels, einer Akkumulation von ADP - der Vorstufe von ATP- und von Laktat - dem Endprodukt der anaeroben Glykolyse. Durch die pathologisch veränderten ADP-Spiegel kommt es wiederum zur Aktivierung der Adenylatzyklase, welche ADP zu AMP degradiert und dieses wiederum abbaut, sodass es im Endeffekt zu einem Verlust an Basen und Nukleosiden kommt²³.

In der Regel ist etwa eine Stunde nach dem Auftreten eines Myokardinfarkts die Mehrheit der betroffenen Kardiomyozyten irreversibel geschädigt. Im betroffenen Gewebe kommt es zu einer Absenkung des physiologischen pH-Wertes hin zu einem sauren Milieu, kennzeichnend für eine Entzündung. Des Weiteren ist ein Mangel an Glykogen im Gewebe zu verzeichnen. Die nekrotischen und verletzten Zellen sowie die EZM setzen ROS und Gefahrensignale wie DAMP's (*Damage Associated Molecular Patterns*) frei²⁶. Dazu zählen ATP, IL1- α , RNA, mitochondriale DNA, S100 Proteine und die aus Fibroblasten sekretierten Moleküle Fibronectin Extradomäne A und HA, sowie das DNA Stabilisatorprotein HMGB1 und DNA-Chaperone wie Hitzeschockproteine²⁶⁻²⁸. All diese DAMP's werden von PRR (*Pattern-Recognition-Rezeptoren*) auf u.a. Immunzellen erkannt. Ein prominenter Rezeptor dieser Klasse ist der TLR (*Toll-like Rezeptoren*), der sich sowohl auf Immunzellen, aber auch auf Endothelzellen, Fibroblasten und Kardiomyozyten befindet²⁶. Die Aktivierung dieses Rezeptors, setzt eine Signalkaskade in Gang, welche im Ergebnis eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B zu Folge hat. Dadurch kommt es zur Transkription bzw. Produktion proinflammatorischer Zyto- und Chemokine, sowie von TNF- α und Adhäsionsmolekülen^{26,29}. Durch die Akkumulation von Laktat kommt es außerdem noch zu einer Veränderung des osmotischen Gleichgewichts, sodass ein Anschwellen der Myozyten durch die Ausbildung eines Ödems die Folge ist²³. Zusätzlich kommt es durch die hypoxischen Bedingungen ebenfalls zu einem Absterben von Endothelzellen³⁰. Diese setzen lösliche proapoptotische Faktoren frei, welche einen weiteren Initiator des Untergangs der Kardiomyozyten darstellen³⁰. Durch die Nekrose der Kardiomyozyten, werden Matrix verdauende Proteasen, sogenannte MMPs freigesetzt. Diese degradieren die EZM und setzen u.a. die darin gebundenen Zyto- und Chemokine frei. Zusammen mit diversen Fragmenten dieser Matrix, kommt es zur Aktivierung der Endothelzellen. Im Ergebnis steigt die Permeabilität der Gefäße und Plasmabestandteile gelangen in das Gewebe. Es ändert sich somit die Matrix um die abgestorbenen Kardiomyozyten und unterstützt so provisorisch die restlichen Zellen des Myokards³¹.

In diesem Kontext sei darauf verwiesen, dass die Reperfusion, also die Wiederherstellung der Blutversorgung, einen nicht unerheblichen Schaden verursacht. Obgleich die Reperfusion für das Überleben des Myokards von essenzieller Bedeutung ist, führt sie paradoxerweise zu einer zusätzlichen Schädigung der Kardiomyozyten durch das plötzliche Anfluten von ROS und Immunzellen. Diese Form der Schädigung wird daher auch als Reperfusionsschaden bezeichnet^{32,33}. Vergleichbar ist dieser Prozess im Menschen mit der Wiederherstellung der Perfusion durch eine erfolgreiche PCI. Daher ist die Durchführung einer Reperfusion im Mausmodell eine notwendige Voraussetzung, um die stattfindenden Prozesse mit denen des menschlichen Organismus vergleichbar zu machen.

1.2.2 Die Entzündungsreaktion

Nach einem erfolgten Myokardinfarkt tritt nun eine komplexe und dynamische Immunantwort auf, die eine zentrale Rolle für die Gewebeschädigung und auch dessen Reparatur spielt. Involviert ist dabei sowohl die angeborene, als auch die erworbene/adaptive Immunabwehr³⁴. Die folgenden Abschnitte beschreiben die verschiedenen Phasen und Mechanismen dieser Immunantwort.

1.2.2.1 Neutrophilen Granulozyten

Nach einem Myokardinfarkt stellen die Neutrophilen Granulozyten die erste Klasse der Immunzellen des angeborenen Immunsystems dar, die das geschädigte Gewebe infiltrieren³⁵. Sie sind eine Gruppe der Leukozyten, die mit 55-70% den größten Anteil im Blut ausmacht³⁶. Sie sezernieren Zyto- und Chemokine, aber auch ROS und MMP's, welche die Immunantwort fördern und u.a. Monozyten rekrutieren^{37,38}. Monozyten sind in der Lage untergegangene Kardiomyozyten und andere Zelltrümmer zu phagozytieren³⁹. Neben dieser Funktion kommt es aber auch zu einer Interaktion von CXC-Chemokinen mit dem CXC-Rezeptor 2, woraufhin es zu einer Konformationsänderung der Neutrophilen kommt. Diese adhären dann an der Endotheloberfläche über L- und P-Selektine. Zusätzlich werden β -Integrine aktiviert, was nachfolgend die Bindung an ICAM-1 und VCAM-1 fördert^{40,41}.

Durch die erhöhte Permeabilität des Endothels wird so die Migration der Neutrophilen in das geschädigte und entzündete Gewebe erleichtert⁴².

1.2.2.2 Monozyten und Makrophagen

Mit etwa 10% machen die Monozyten nur einen geringen Teil der Gesamtleukozyten im Blut aus³⁹. Man unterteilt sie in zwei verschiedene Gruppen, welche anhand des Lymphozytenantigens 6C (Ly6C) unterschieden werden. Beschrieben werden dabei Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten⁴³⁻⁴⁵. Erstere infiltrieren direkt nach den Neutrophilen Granulozyten in das Infarktgebiet⁴⁶. Dies geschieht durch deren Reaktion auf endothelgebundene Faktoren wie CCL2 und MCP-1. Der Rezeptor CCR-2 spielt hier eine wichtige Rolle für die Interaktion⁴⁶. Die

Hauptaufgabe dieser Monozyten ist die Phagozytose von Zelltrümmern in dem Infarktgebiet, zum Beispiel von abgestorbenen Kardiomyozyten⁴⁶.

Im nächsten Schritt wandern dann Ly6Cl^{low} Monozyten in das Infarktgebiet ein. Diese werden über den Rezeptor CX3CR1 rekrutiert und wirken über eine Ausschüttung von TGF-beta und IL-10 antiinflammatorisch, stimulieren die Angiogenese und aktivieren die Fibroblasten zu Myofibroblasten⁴⁶.

Parallel zu diesen beiden Gruppen gibt es noch weitere Makrophagen-Phänotypen im Gewebe. Zwei davon sind residente MHCII^{high} und MHCII^{low} Makrophagen, die jedoch beide CCR2 negativ sind. Ein weiterer Phänotyp, der sich aus den eingewanderten Monozyten entwickelt, exprimiert sowohl CCR2 als auch für MHCII⁴⁷. Trotz ihres Ursprungs aus der Zirkulation verlieren diese Zellen jedoch mit der Zeit die Expression von CCR2⁴⁸.

1.2.2.3 Lymphozyten

Bei den Lymphozyten handelt es sich T- und B-Zellen sowie Natürliche Killer (NK)- Zellen. Während T- und B- Zellen zu der erworbenen/adaptiven Immunabwehr gehören, sind NK-Zellen Teil des angeborenen Immunsystems⁴⁹. Während Neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen relativ schnell das Infarktgeschehen infiltrieren⁴⁶, wandern Lymphozyten, vorwiegend T und B-Zellen, erst zu späteren Zeitpunkten (Tag 3-7) verstärkt in das geschädigte Herzgewebe ein⁵⁰.

Bei den T-Zellen unterscheidet man 3 Haupttypen, CD4⁺ T-Helferzellen, regulatorische T-Zellen (Tregs) und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. Die T-Helferzellen lassen sich in proinflammatorische (z.B. Th1, Th17) oder antiinflammatorische Subtypen (z.B. Th2) einteilen⁵¹. Die Tregs wirken antiinflammatorisch und sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 gekennzeichnet⁵². Wesentlich für die Einteilung der CD4⁺ Zellen in Subtypen sind die Unterschiede bezüglich ihrer Transkriptionsfaktoren, Oberflächenrezeptoren und produzierten Zytokine⁵². Die CD8⁺ T-Zellen übernehmen durch Ausschüttung zytotoxischer Proteine aus der Gruppe der Granzyme und Perforine wichtige Funktionen bei der Elimination von Pathogenen, spielen aber auch bei chronischen Entzündungsreaktionen eine zentrale Rolle⁵³. Neben den genannten Haupttypen von T-Lymphozyten gibt es weitere Subtypen, zu denen auch die sogenannten unkonventionellen T-Zellen (γδ T-Zellen, NK T-Zellen) gehören⁵². Die Funktionen der verschiedenen Lymphozyten-Populationen für das kardiale *Remodeling* nach I/R sind noch weitgehend ungeklärt, wobei sich in verschiedenen Studien eine protektive Rolle der Tregs abzeichnet^{54,55}.

1.2.3 Die Rolle der Fibroblasten

Fibroblasten sind nach einem Myokardinfarkt maßgeblich an der Wundheilung, dem kardialen *Remodeling*, der Narbenbildung⁵⁶ sowie dem Überleben der verbliebenen Kardiomyozyten beteiligt⁵⁷. Aktivierte Fibroblasten produzieren große Mengen an EZM Bestandteilen, welche

die Bildung des Narbengewebes unterstützen⁵⁶. Als Marker für den Nachweis von Fibroblasten sind PDGFR α , Kollagen1 α 1, Tcf21 und Postn zu nennen⁵⁸. Gemäß einer Studie aus 2018 von Fu *et al.* erreicht die Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten an Tag 2-4 nach dem Myokardinfarkt sein Maximum⁵⁶. Bis etwa 1 Woche nach Ischämie erfolgt eine Differenzierung zu Myofibroblasten⁵⁶, was vor allem durch CCL2 und TGF- β 1 gefördert wird^{59,60}. Fibroblasten selbst, aber auch Makrophagen produzieren TGF- β 1, welches wiederum die Bildung von EZM-Bestandteilen fördert^{58,61}. So produzieren Myofibroblasten eine beachtliche Menge an Kollagen vom Typ I und III, sowie HA und Fibronektin^{59,60}. Diese provisorische Matrix unterstützen den geschädigten Herzmuskel und fördern die Bildung des Narbengewebes. TGF- β 1 hemmt allerdings auch den Matrixkatabolismus durch Bildung der Gewebeinhibitoren von Matrixmetalloproteinase (TIMP)^{59,60}. Kommt es jedoch zu einem Überschießen dieser Reaktion, ist die Folge eine Fibrose, welche das Herz schädigt und in seiner Funktion stark einschränkt^{59,60}.

Als wichtige Marker der Myofibroblasten sind hier POSTN, aber auch α SMA und CTHRC1 zu nennen^{58,61}.

Sieben bis zehn Tag nach Myokardinfarkt proliferieren die Fibroblasten nur noch sehr wenig und auch die Bildung von α SMA ist stark reduziert. Es ist bereits eine Narbe im Herzgewebe ersichtlich⁵⁶ - sowohl mikro- als auch makroskopisch. Kovalente Quervernetzungen tragen zur Stabilisierung der Narbe bei. Die dafür verantwortlichen Enzyme sind Transglutaminasen, Lysyl-Oxidasen und auch Lysyl-Hydroxylasen. Durch die kovalenten Quervernetzungen erhöht sich die Steifigkeit des Narbengewebes, was die Eigenschaften des betroffenen Areals verändert und so die mechanischen und signaltransduktorisches Fähigkeiten des Herzens reduzieren⁶². Auf Dauer bleiben die Fibroblasten in einem aktivierten Zustand im ischämischen Gebiet vorhanden und werden auch als Matrifibrozyten bezeichnet⁵⁶. Diese unterstützen die Aufrechterhaltung der Narbe und konnten auch bei Menschen nachgewiesen werden^{56,63}. Für die *Hmmr*-OE Mäuse wurden 3 und 7 Tage nach Infarkt in unserem Institut von Dr. Anne Petz und Dr. Daniel Gorski eine *single cell* Analyse (*scRNA-seq*) durchgeführt, um die akute zelluläre Reaktion zu untersuchen. In einer differenziellen Genexpressionsanalyse zeigte sich, dass *Hmmr*-überexprimierende Fibroblasten eine Herabregulation verschiedener fibrillärer Kollagene sowie von Molekülen, die die Organisation von Kollagenfibrillen unterstützen, aufweisen (Abbildung 3). Des Weiteren ergab eine spezielle Verlaufsanalyse, dass die Überexpression von *Hmmr* die Differenzierung der kardialen Fibroblasten beschleunigte (Abbildung 4). Insgesamt deuten die Daten dieser Studie auf eine veränderte/beschleunigte Dynamik der Fibroblastenaktivierung und der Fibroblastengenexpression in Richtung eines antifibrotischen Phänotyps hin. Aufgrund der Ergebnisse dieser Verlaufsanalyse wurden einige Proteine dieser veränderten Gene ausgewählt und immunhistochemisch angefärbt (s. Abschnitt 2.6.3).

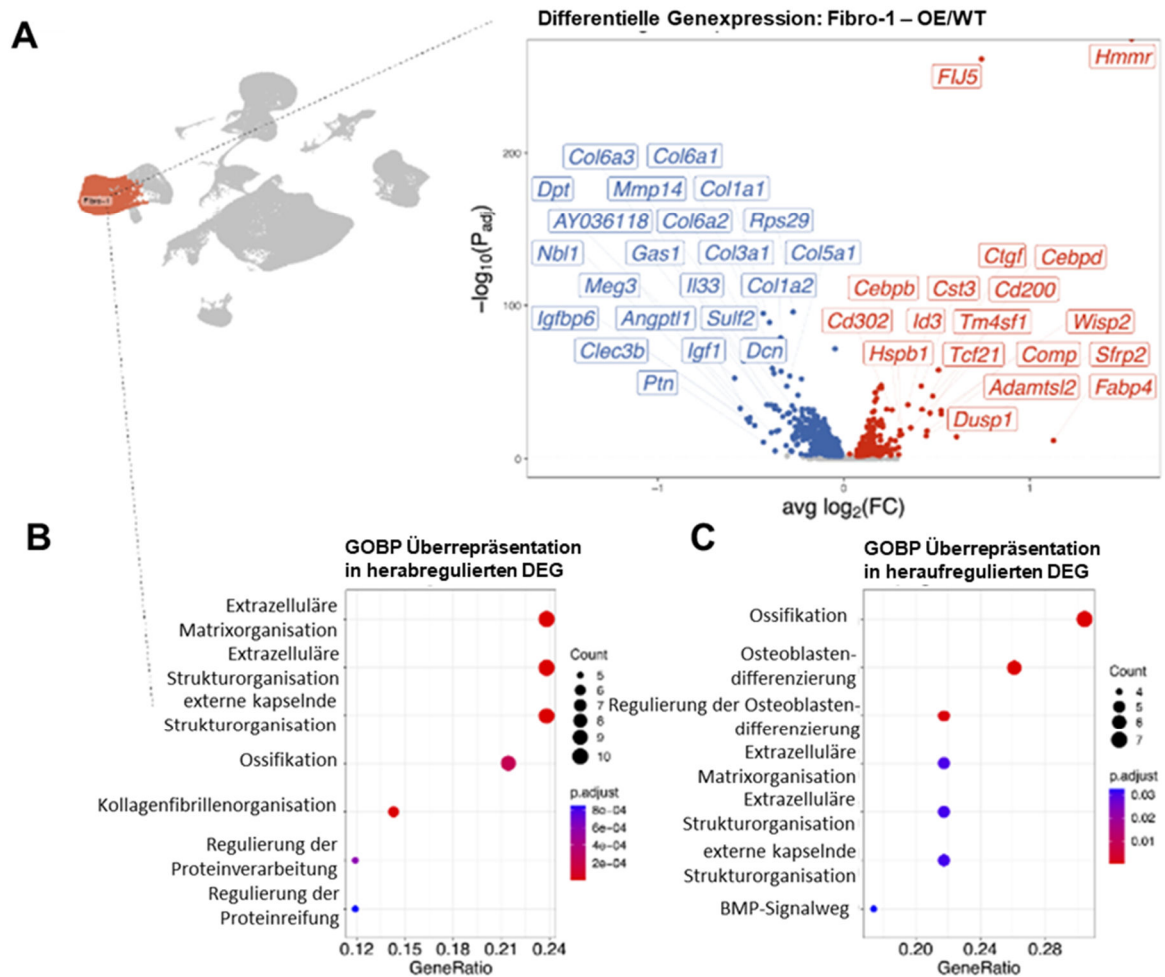


Abbildung 3: Veränderte Gene des Fibro-1 Clusters der Einzelzellanalyse 3 und 7 Tage nach I/R gepoolt. Zu diesem Zweck wurden einzelne lebenden Zellen des Ventrikels mittels FACS isoliert und mit Hilfe der Chromium-Plattform 10X *Genomics* sequenziert. **A**, *Volcano plot* der unterschiedlich exprimierten Gene in aktivierten Fibroblasten ("Fibro-1"-Cluster). Rote Punkte sind signifikant hochregulierte Gene in *Hmnr*-OE-Zellen, blaue Punkte sind signifikant herunterregulierte Gene in *Hmnr*-OE-Zellen, und graue Punkte sind nicht signifikant regulierte Gene. **B**, Überrepräsentation von GOBP-Begriffen (*Gene Ontology Biological Processes*) in den signifikant heraufregulierten Genen. **C**, Überrepräsentation von GOBP-Begriffen in den signifikant herabregulierten Genen. Differenziell exprimierte Gene (DEG). Die Erhebung dieser Daten erfolgte durch Dr. Anne Petz und Dr. Daniel Gorski (nicht publiziert).

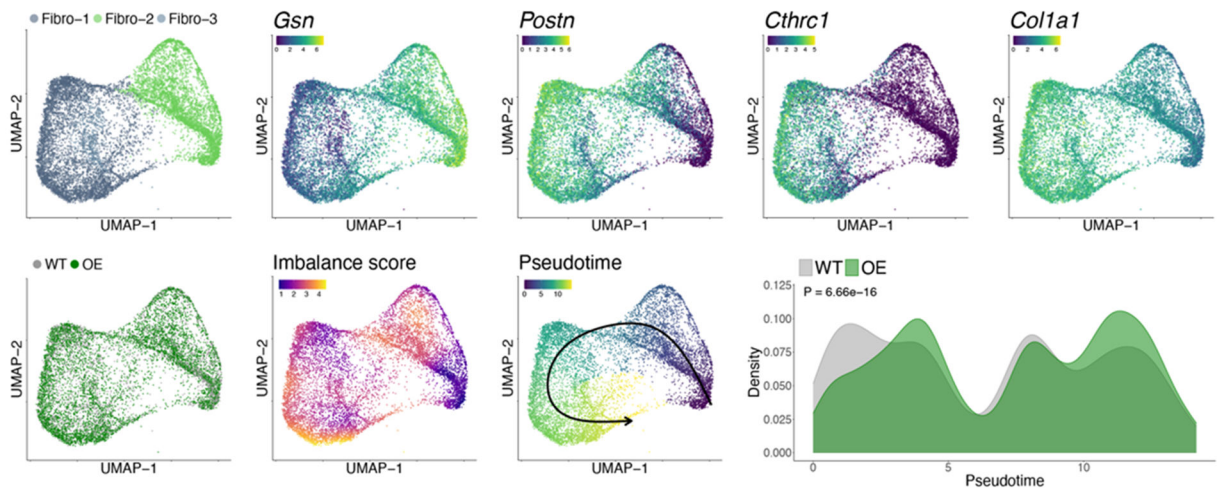


Abbildung 4: Ableitung von Trajektorien, Pseudozeitordnung und differenzielle Progressionsanalyse von WT- und RHAMM-OE-Herzfibroblasten. Oben (von links nach rechts): UMAP der Fibroblastenuntergruppe und Expression der kanonischen Differenzierungsmarker *Gsn*, *Postn*, *Cthrc1* und *Col1a1*. Unten (von links nach rechts): Verteilung der WT- und *Hmmr*-OE-Zellen in der Fibroblastenuntergruppe, Ungleichgewichtsanalyse der Genotypen, Trajektorieninferenz (Pfeil) und Pseudozeitordnung der kardialen Fibroblasten von einem ruhenden zu einem aktivierten Phänotyp, Verteilung der WT- und RHAMM-OE-Fibroblasten-Pseudozeitwerte. Kolmogorov-Smirnov-Test. Die Erhebung dieser Daten erfolgte durch Dr. Anne Petz und Dr. Daniel Gorski (nicht publiziert).

1.3 Das Hyaluronsäuresystem

1.3.1 Die Hyaluronsäure

Bei der Hyaluronsäure (HA) handelt es sich um ein Glykosaminoglycan, also um ein lineares saures Polysaccharid bestehend aus sich wiederholenden Disacchariden, welches einen wesentlichen Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM) ausmacht. Grundbausteine der Hyaluronsäure sind die D-Glucuronsäure und das N-Acetyl-D-Glukosamin, welche β 1 \rightarrow 3 glykosidisch miteinander verknüpft werden. Die Disaccharide werden dann von N-Acetylglukosamin glykosidisch β 1 \rightarrow 4 an die nächste Glucuronsäure geknüpft^{64,65}. Das Molekulargewicht der hochmolekularen HA Polymere reicht dabei je nach Lokalisation von 1000-10.000 kDalton (kDa)⁶⁶. Im Gegensatz zu anderen Molekülen dieser Klasse, wie etwa Chondroitinsulfat oder auch Keratinsulfat, wird die Hyaluronsäure nicht modifiziert, beispielsweise sulfatiert oder acetyliert^{64,65}. Ursächlich dafür ist die Art der Bildung, die an der Membran stattfindet und nicht etwa am Golgi-Apparat, wie es für die anderen Glykosaminoglykane der Fall ist^{64,65}.

In Abb.5 ist erkennbar, dass das Disaccharid über eine Carboxylgruppe verfügt, die unter physiologischen Bedingungen bei einem pH von annähernd 7,4 anionisch vorliegt. Somit liegt die Hyaluronsäure als Polysaccharid auch polyanionisch vor. Es ist damit ein sehr hydrophiles Molekül und dient in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers als Wasserspeicher. Bereits ein Disaccharid ist so in der Lage 15 Wassermoleküle in Form einer Solvathülle zu

binden^{67,68}. Hyaluronsäure kommt endogen zwar in nahezu allen Geweben vor, jedoch vermehrt in der Synovialflüssigkeit, im Glaskörper des Auges sowie in der Haut und auch der Nabelschnur⁶⁹. Pharmakotherapeutisch wird es deshalb auch in Form eines Augengels/Augentropfen in der Apotheke vertrieben, um trockenen Augen vorzubeugen. Des Weiteren fungiert die Hyaluronsäure als Signalmolekül in diversen Entzündungsprozessen⁷⁰ sowie in der Embryogenese⁷¹. Während eines inflammatorischen Geschehens kann die HA unter anderem über die HASen (s.u.) oder über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in Oligosaccharide gespalten werden. Je nach Kettenlänge bedingen die HA-Fragmente dann die Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden⁷², wobei die genau Funktionen der jeweiligen HA-Fragmente kontrovers diskutiert wird. Ursprünglich ging man davon aus, dass native Hyaluronsäure mit einem hohen Molekulargewicht beispielsweise eine antimigratorische und antiproliferative Wirkung zeigt und in Geweben für eine Hydratation und Widerstandsfähigkeit gegen mechanischen Stress sorgt⁷³⁻⁷⁵. Dahingegen zeigt fragmentierte Hyaluronsäure mit einem niedrigeren Molekulargewicht eine andere Funktion. Niedermolekulare Hyaluronsäure fördert beispielsweise durch die Interaktion mit dem Hyaluronsäurerezeptor RHAMM eine erhöhte Zellmigration- und proliferation als Reaktion auf Verletzungen⁷³⁻⁷⁵.

In einer Studie von Dong *et al.* aus dem Jahre 2016 wurde die proinflammatorische Funktion der niedermolekularen HA-Fragmente jedoch in Frage gestellt. Auch war unklar, ob eine Fragmentierung der HA inflammatorische Prozesse in Gang setzt oder ob eben diese Fragmente das Ergebnis einer Entzündung darstellen. Im Ergebnis kam diese Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass exogen zugeführte HA-Fragmente unterschiedlicher Kettenlänge durch eine Endotoxin-Verunreinigung zu einem proinflammatorischen Phänotyp führten. Nach Entfernung eben dieser Endotoxine ging die entzündungsfördernde Wirkung der fragmentierten HA verloren. Diese Studie macht deutlich, wie entscheidend eine Endotoxin-Kontamination für die Interpretation der Funktionalität einzelner EZM-Bestandteile sein kann⁷⁶.

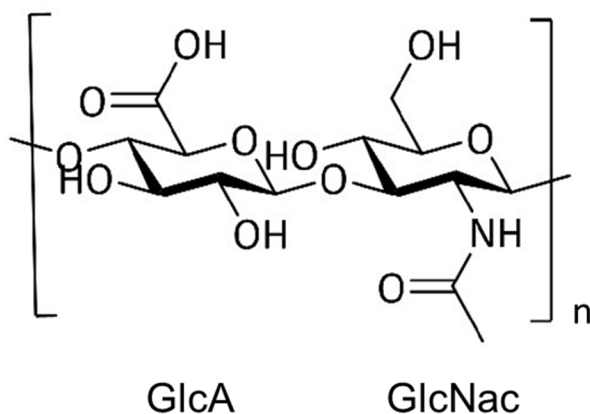


Abbildung 5: Molekularstruktur der Hyaluronsäure (modifiziert nach ⁷⁷)

1.3.2 Die Synthese der Hyaluronsäure

Die endogene Synthese von Hyaluronsäure erfolgt vorwiegend in den Fibroblasten und anderen Zellen des Bindegewebes und wird durch komplexe biochemische Prozesse gesteuert. Dabei wird die Hyaluronsäure, wie bereits oben erwähnt, nicht am Golgi-Apparat, sondern durch membranständige Hyaluronsäuresynthasen – kurz HAS – synthetisiert. Die Synthese von Hyaluronsäure beginnt mit der Umwandlung von Glucose und anderen Vorläufern in die durch UDP an C1 aktivierten Monomere, welche sich intrazellulär befinden. Dazu werden die D-Glucuronsäure und das N-Acetyl-D-Glucosamin in einer Magnesium-abhängigen Reaktion β 1 \rightarrow 3 glykosidisch miteinander verknüpft. Die Disaccharide werden dann von N-Acetylglucosamin glykosidisch β 1 \rightarrow 4 an die nächste Glucuronsäure, jeweils an das reduzierte Ende der Zuckerkette geknüpft^{65,78}. So entstehen lange, unverzweigte Ketten. Das entstandene Produkt wird durch die Hyaluronsäuresynthasen direkt in den Extrazellularraum synthetisiert und extrudiert⁷⁹.

Insgesamt gibt es von den Hyaluronsäuresynthasen sowohl im menschlichen als auch murinen Organismus 3 Isoenzyme, welche durch alternatives *Splicing* aus der mRNA entstehen – HAS1, HAS2 und HAS3^{65,80}. Die Gene für diese Enzyme befinden sich dabei je nach Spezies auf unterschiedlichen Chromosomen, sind aber zwischen den Wirbeltieren in ihrer Sequenz hochkonserviert⁸¹. Je nach Gewebe unterscheiden sich diese in ihrem Expressionslevel, aber auch in ihrer Lebensdauer und der Menge und Länge der synthetisierten Hyaluronsäure. So produziert die Hyaluronsäuresynthase 2 insgesamt die größte Menge an Hyaluronsäure im menschlichen Organismus⁸². Sie unterscheiden sich aber auch in der Relevanz für das Überleben eines Organismus. So konnte von Camenisch *et al.* gezeigt werden, dass ein HAS2 *Knockout* zu Fehlern in der embryonalen Herzbildung führt und so an Tag 9,5-10 in der Maus zur Letalität des Embryos führt⁷¹.

Die endogene Synthese von Hyaluronsäure unterliegt jedoch einer komplexen Regulation, die durch verschiedene Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und mechanische Signale beeinflusst werden kann. So konnte unsere Arbeitsgruppe bereits 2018 zeigen, dass die Hyaluronsäuresynthese durch IL1- β über eine Aktivierung der Hyaluronsäuresynthase 3 induziert werden kann⁸³. Dahingegen bewirkt das Cumarin-Derivat 4-Methylumbelliferon (4-MU) die Inhibition aller Hyaluronsäuresynthasen. Dabei hemmt es kompetitiv die UDP-Glucuronyltransferase und wird anstelle des endogenen Monomers selbst zum 4-Methylumbelliferon-Glukuronid glukuronidiert⁸⁴. In der Pharmakotherapie macht man sich dessen Fähigkeit als Choleretikum und muskulotropes Spasmolytikum zu Nutze⁸⁵. Auch gibt es eine negative Rückkopplung, wobei die Menge der HAS2 und – 3 mRNA abhängig ist von der Hyaluronsäuremenge im jeweiligen Gewebe⁸⁴. Trotz dieser Erkenntnisse ist die Regulation der Hyaluronsäure jedoch nur teilweise verstanden. Weitere Forschung ist unerlässlich, um

neue therapeutische Ansätze zur Behandlung von Hyaluronsäure-assoziierten Erkrankungen zu entwickeln.

1.3.3 Zielstrukturen innerhalb der Hyaluronsäure-haltigen Matrix

Wie bereits oben erwähnt, dient HA als Signalmolekül in verschiedenen physiologischen und auch pathophysiologischen Prozessen (s. Abschnitt 1.3.1). Interaktionen erfolgen dabei über HA-bindende Protein oder HA-Rezeptoren, wobei CD44 und RHAMM die prominentesten dieser Art darstellen⁸⁶. Generell unterscheidet man zwischen HA-bindenden Proteinen/Rezeptoren mit und ohne Linkmodul für HA. Beispiele für solche Strukturen mit Linkmodul sind CD44, LYVE-1, HARE/STABILIN-1 und HARE/STABILIN-2⁸⁷.

CD44 ist ein transmembraner Rezeptor, wobei das Linkmodul in die EZM hineinragt⁸⁸. Durch alternatives *Splicing* existieren mehrere Isoformen. Kommt es an diesem Rezeptor zur Bindung von HA, so erfolgt eine Konformationsänderung, welche über Tyrosinkinasen Src und Rho GTPasen eine Signalkaskade in Gang setzt. CD44 wird dabei sowohl auf Fibroblasten⁸⁹⁻⁹¹ als auch auf Immunzellen⁹² exprimiert. Zu den HA-Rezeptoren ohne Linkmodul für HA gehört beispielsweise RHAMM⁸⁷.

Allgemein werden HA-bindende Proteine auch Hyaladherine genannt. Dazu zählen beispielsweise auch SPACR und SPACRCAN, welche in der Retina des Auges vorkommen^{93,94} oder auch Siglec-9, das im Immunsystem für die Pathogen-Abwehr essenziell ist⁹⁵. Überdies gibt es noch andere Strukturen, die extrazellulär vorkommen und mit HA eine Interaktion eingehen können. Diese werden unter dem Begriff Hyalecta zusammengefasst, die eine Gruppe der HA-bindenden Proteoglykane darstellt. Dazu zählen Aggrecan, Neurecan, Brevican aber auch Versican^{96,97}, welches ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe untersucht wird. Bereits bekannt ist, dass Versican die Zellproliferation, aber auch die Migration und Adhäsion modulieren kann⁹⁸ sowie das vaskuläre *Remodeling*⁹⁹ reguliert und die Bindung von Immunzellen über CD44, L- und P-Selektin unterstützt^{100,101}.

1.3.3.1 RHAMM – ein Rezeptor für die Hyaluronsäure-vermittelte Motilität

1.3.3.1.1 Aufbau und Lokalisation von RHAMM

Bei RHAMM (*Receptor for Hyaluronan Mediated Motility*) handelt es sich um ein saures *coiled-coil* Protein, welches auch unter dem Synonym CD168 bekannt ist¹⁰². Ursprünglich wurde RHAMM aus dem Kulturmedium von 3T3-Zellen und embryonalen Hühnerherzfibroblasten isoliert^{103,104}. Dieser Hyaluronsäure-Rezeptor kommt sowohl intra- als auch extrazellulär sowie nukleär vor^{73,102-104}. Lokalisiert ist das Gen *Hmmr* im menschlichen Organismus auf dem

Chromosom 5 (5q33.2-qter)⁷³ und kodiert in voller Länge für das 85 kDA Protein RHAMM^{102,105,106}. In der Maus ist das *Hmmr* Gen auf dem Chromosom 11 lokalisiert (24.4 cM)¹⁰⁷. Die mRNA besteht aus 18 Exons^{73,108} und 2 Startcodons^{73,102,109,110}. Durch alternatives *Splicing* und die Verwendung unterschiedlicher Startcodons können so verschiedene Subtypen entstehen^{73,102,106,110-112}, wobei sich die Anzahl und Art der Isoformen je nach Spezies unterscheidet. Im menschlichen Organismus werden 4 Isoformen unterschieden: RHAMM A (*full length*), RHAMM B, RHAMM C und RHAMM D. In der Maus hingegen unterscheidet man 5 Isoformen: RHAMM *full length* (FL), RHAMM X1, RHAMM X2, RHAMM X3 und RHAMM X4¹¹¹.

Im menschlichen Organismus stellen die Formen A-D die wichtigsten dar und werden oftmals auch als 1-4 bezeichnet. In anderen Quellen wird auch von weiteren Isoformen berichtet, die durch Spleißen des Exons 2-4¹¹³, 4, 5 und 13¹¹³⁻¹¹⁵ entstehen. Vor allem Im Zusammenhang mit diversen Krebserkrankungen konnten verschiedene Isoformen nachgewiesen werden¹¹⁶⁻¹²¹. Welche Funktionen die Isoformen genau haben ist noch nicht hinreichend untersucht. Die Isoform RHAMM B wird jedoch häufig bei Krebserkrankungen exprimiert und fördert in einem Mausmodell die Lebermetastasierung^{122,123}. Am besten untersucht ist jedoch die Exon-4 defiziente Form RHAMM V3⁷³. Diese Isoform ist im Tumorgewebe häufiger nachweisbar als im gesunden Gewebe^{106,124}, wobei die Ursache noch nicht klar ist⁷³. Interessanterweise ist RHAMM V3 dabei in Mikrotubuli lokalisiert und induziert bei einer Überexpression eine onkogene Transformation^{73,106,125}.

In der Maus entstehen die Isoformen X1 und X2 durch alternatives Spleißen, wobei X3 aus der alternativen Verwendung des Startcodons resultiert. X4 hingegen entsteht aus einer Kombination beider Mechanismen¹²³.

Wie bereits oben erwähnt verfügt RHAMM über kein Link-Modul, jedoch besitzt es eine HA-Bindungsstelle in der sogenannten BX₇B-Domäne am COOH Terminus¹²⁶. B steht dabei für die Aminosäure Lysin oder Arginin und X für eine nicht-saure Aminosäure (aa), die sich innerhalb aa635-646 und aa657-666 befindet^{73,109,127}. Hier konnte gezeigt werden, dass eine ionische Interaktion mit einem Hyaluronsäuremolekül stattfindet¹⁰⁹. Dieser Bereich zeigt eine Überlappung mit der carboxylreichen Leucin-Zipper-Domäne, welche für die Interaktion mit den Zentrosomen während der Mitose verantwortlich ist^{73,128}. Das N-terminale Ende und die Exon-4 kodierende Region interagieren während der Interphase mit den Mikrotubuli^{73,106,125,128}. Insgesamt handelt es sich bei RHAMM um keinen (trans-)membranen Rezeptor. Extrazelluläres RHAMM ist dabei über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker an die Membran gebunden, kommt aber auch intrazellulär und nukleär vor¹²⁹.

Interessanterweise verfügt RHAMM über kein Signalpeptid für den Export über den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Reticulum¹³⁰, weshalb vermutet wird, dass es über einen unkonventionellen Transportmechanismus an die Zelloberfläche transportiert wird^{73,131-133}.

Bisher konnte jedoch noch nicht herausgefunden werden, welcher Mechanismus hier für den Export verantwortlich ist⁷³. Einmal extrazellulär exportiert assoziiert RHAMM mit der Zelloberfläche durch Andocken an diverse transmembrane Rezeptoren wie CD44, PDGFR und TGF- β 1⁷³ aber auch mit der HA-Synthase¹³¹. So ist RHAMM in der Lage, Signale ins Zellinnere zu übertragen, welche die Zellmigration/motilität beeinflussen^{73,120,134-138}. Intrazellulär ist RHAMM vor allem mit Mikrotubuli assoziiert und wurde hier erstmals von Assman und Kollegen nachgewiesen, was einige Jahre später von Maxwell *et al.* bestätigt wurde^{106,125,128}.

1.3.3.1.2 (Patho-)physiologische Funktionen des Rezeptors RHAMM

Extrazellulär ist RHAMM auch in der Lage mit CD44 zu interagieren, sodass beide an verschiedenen Zellfunktionen beteiligt sind wie etwa an der Zellmotilität, der Wundheilung und der Proliferation^{127,134,139-142}. Unter physiologischen Bedingungen sind die Expressionslevel von RHAMM sehr gering¹⁴³, wobei die Expression unter pathophysiologischen Bedingungen stark ansteigt^{142,144}. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass RHAMM an der Migration von glatten Muskelzellen nach Verletzungen involviert ist¹⁴⁵ und auch die Proliferation von embryonalen Fibroblasten fördert¹⁴⁶. Bereits 2015 konnte in Zebrafischen gezeigt werden, dass eine Überexpression von RHAMM die Regeneration der Herzen bewirkt¹⁴⁷. Dazu sollte man wissen, dass Zebrafische die Fähigkeit besitzen, Kardiomyozyten nach einer Organschädigung zu vermehren bzw. durch neue Kardiomyozyten zu ersetzen¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Nach Resektion der Herzspitze wurde bei erwachsenen Zebrafischen eine erhöhte RHAMM-Expression nachgewiesen. Weiterhin wurde hier untersucht, wie sich ein RHAMM-*Knockdown* auf die Narbengröße nach einer Ventrikelresektion auswirkt. Diese war deutlich größer und gibt so einen Hinweis darauf, dass RHAMM für die Herzregeneration essenziell ist¹⁴⁷. In *in vivo* Studien an RHAMM-*Knockout* Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese eine Wundheilungsstörung aufweisen und unter neurologischen Entwicklungsstörungen leiden^{73,142,151-153}.

RHAMM ist vor allem aus der Tumorforschung bekannt, in der gezeigt werden konnte, dass Tumore mit einer hohen RHAMM Expression eine schlechte Prognose aufweisen, da RHAMM sowohl die Proliferation als auch Migration und Metastasierung von Krebszellen fördert^{73,129,154,155}. Dabei ist eine hohe RHAMM-Expression mit einem schlechteren Outcome und einer höheren Metastasierungsrate der Tumore assoziiert^{73,154,155}. Im Bereich der Kardiologie ist RHAMM noch nicht hinreichend erforscht. Bekannt ist jedoch, dass RHAMM in der akuten Phase nach einem Myokardinfarkt hochreguliert ist⁸⁶. Da sich unsere Arbeitsgruppe bereits seit vielen Jahren mit der Erforschung des Hyaluronsäuresystems im Zusammenhang mit der myokardialen Ischämie/Reperfusion beschäftigt, stellte die Frage nach der Funktion von RHAMM im Myokardinfarkt ein äußerst interessantes Forschungsprojekt dar.

1.3.3.1.3 Mögliche Signaltransduktionswege von RHAMM

Während des Zellzyklus ist RHAMM an den Spindel Assembly Checkpoints (SAC) lokalisiert und assoziiert dort mit anderen MAPs wie TPX2, um die Spindel Dynamik und auch Mikrotubuli Stabilität zu regulieren. RHAMM mediierte Mikrotubuli-Funktionen sind dabei durch einen BRCA1/BRAD1 Komplex reguliert, welches RHAMM für die Ubiquitinierung und damit proteasomale Degradation kennzeichnet. Dieser Mechanismus kann durch die Aktivierung von der Aurora Kinase A (AURKA) gehemmt werden⁷³.

Eine Interaktion von extrazellulärem RHAMM mit HA kann mit anderen transmembranen Proteinen kolokalisieren und so zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege führen⁷³. Am häufigsten kommt es dabei zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung des Erk1/2 Signalweges. Dieser Weg beeinflusst die Zellmigration durch Regulation der Zelladhäsions-Dynamik über die fokale Adhäsionskinase (FAK) oder es findet eine Translokation von Erk1/2 in den Nukleus statt. Dies fördert die Aktivierung von bisher nicht genauer beschriebenen Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription von mito- und motogenen Genen fördern. Alternativ kann Erk1/2 den Eintritt in die Mitose beeinflussen, indem es die Bildung der mitotischen Spindel reguliert, welche für den effektiven Verlauf der Mitose erforderlich ist⁷³.

Eine Aktivierung von RHAMM kann auch in der Translation von wachstumsfördernden und die Zellmotilität fördernden Genen über den ROCK-eIF4 Signalweg münden. Des Weiteren erhöht RHAMM die Stabilität von β -Catenin durch Inhibition des β -Catenin Degradation-Komplexes und fördert so die nukleäre Translokation und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription des Onkogens c-MYC erhöhen mit dem Resultat einer erhöhten Zellproliferation⁷³.

1.3.4 Abbau der Hyaluronsäure

Der endogene Abbau von Hyaluronsäure im menschlichen Körper ist ein dynamischer Prozess, der von einer Reihe von Enzymen und Mechanismen gesteuert wird. Ein Schlüsselakteur ist dabei die Hyaluronidase, ein Enzym, das für die Spaltung der Hyaluronsäuremoleküle in kleinere Fragmente verantwortlich ist^{156,157}. Im menschlichen Körper sind sechs verschiedene Hyaluronidasen bekannt: HYAL1, HYAL2, HYAL3, PH-20 (oder SPAM1), HYAL4 und HYALP1, wobei HYAL 1 und 2 für den Hyaluronsäurekatabolismus am wesentlichsten erscheinen^{156,157}.

Diese Hyaluronidasen werden von verschiedenen Zellen im Körper exprimiert, darunter Fibroblasten, Immunzellen und epitheliale Zellen. Ihre Aktivität kann durch verschiedene physiologische und pathologische Faktoren beeinflusst werden, zum Beispiel den pH-Wert. Einmal aktiviert, diffundieren die Hyaluronidasen in das umgebende Gewebe. Der Abbau der Hyaluronsäure erfolgt dabei über rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomale Degradation. Dabei hydrolysieren die Hyaluronidasen die β -1,4-glykosidischen Bindungen in

der Hyaluronsäure zwischen dem N-Acetyl-Glucosamin und der Glucuronsäure, wodurch sie in kleinere Fragmente gespalten wird^{156,157}. Je nach Art der Hyaluronidase können dabei unterschiedlich lange Fragmente entstehen. So ist die HYAL1 in der Lage, diese bis hin zu Tetrasacchariden zu spalten⁷⁸. In der Regel erfolgt der Katabolismus der Hyaluronsäure sehr schnell, mit Ausnahme in der Synovialflüssigkeit. Täglich werden ca. 30% der im Körper vorkommenden Hyaluronsäure umgesetzt und wieder neu synthetisiert⁷⁸. Im Durchschnitt beträgt der HA-Umsatz in Wirbeltiergeweben ca. 5 g pro Tag¹⁵⁸. Demgegenüber wird Hyaluronsäure im Blutkreislauf in einer Größenordnung von 30–100 mg pro Tag umgesetzt¹⁵⁹.

Da das pH-Optimum der Hyaluronidasen im sauren pH liegt, weisen diese eine hohe Aktivität in entzündeten Geweben sowie intrazellulär in den Lysosomen auf¹⁶⁰. Für die Herzfunktion wurde eine wichtige Rolle von HYAL2 nachgewiesen. So führte ein HYAL2- *Knockdown* zu Veränderungen der Herzklappen und auch zur Akkumulation von Hyaluronsäure, sowohl im Plasma als auch im Herzgewebe selbst¹⁶¹. Eine solche Dysregulation im Katabolismus kann dann zu verschiedenen pathologischen Zuständen führen, darunter Entzündungen und Gewebeschädigungen, wie man es auch an den Herzklappen erkennen konnte^{161,162}.

Darüber hinaus kann der endogene Abbau von Hyaluronsäure auch durch andere Mechanismen erfolgen. Zum Beispiel können reaktive Sauerstoffspezies, die während oxidativer Stressreaktionen gebildet werden, Hyaluronsäure in einer chemischen Reaktion spalten und somit abbauen¹⁶³.

Von Bedeutung ist außerdem der Abbau durch das *Cell Migration-Inducing and Hyaluronan-Binding* Protein (CEMIP). Dieses baut unabhängig von anderen Enzymen HA ab. Extrazelluläres CEMIP bindet dabei hochmolekulare HA (HMW-HA) und internalisiert diese über Clathrin-beschichtete Vesikel durch Endozytose nach Bindung an Annexin1 (ANXA1). Im Endosom wird HA dann degradiert und wieder in den extrazellulären Raum entlassen¹⁶⁴. Bisher wurde CEMIP im Zusammenhang mit diversen Krebsarten untersucht, wobei dessen Expressionslevel Hinweise auf die Progression des jeweiligen Tumors gibt. Generell kann gesagt werden, dass eine hohe *Cemip*-Expression mit einem schlechteren Outcome im Zusammenhang steht^{164,165}. In unserer Arbeitsgruppe wird die Funktion von CEMIP für das kardiale *Remodeling* nach Myokardinfarkt mithilfe des globalen und des Fibroblasten-spezifischen *Knockouts* im Mausmodell untersucht.

1.3.5 Hyaluronsäure und Entzündung

Für verschieden Erkrankungen, denen ein inflammatorischer Prozess zugrunde liegt, konnte eine Erhöhung in der HA-Plasma und/oder Gewebe-Konzentration nachgewiesen werden. Erste Untersuchungen dazu erfolgten bereits in den 60iger Jahren, in denen ein Zusammenhang zwischen der HA-Konzentration der Gelenkflüssigkeit und dem Alter erkannt wurde. In den 80iger Jahren konnten Dahl und Kollegen zeigen, dass es bei inflammatorischen

Erkrankungen der Gelenke, wie etwa rheumatoider Arthritis, zu einer HA-Anreicherung in der Gelenkflüssigkeit kommt¹⁶⁶. Aber auch bei entzündlicher Darmerkrankung¹⁶⁷, Lungenerkrankungen¹⁶⁸ oder nach MI konnten erhöhte HA-Konzentrationen gemessen werden¹⁶⁹.

Wie bereits oben beschrieben ist HA ein wichtiger Bestandteil der EZM und im Zusammenspiel mit anderen Komponenten essenziell für die Funktionalität und Integrität der Glykokalyx. Diese umgibt das Endothel aller Gefäße luminal und ist daher für die Aufrechterhaltung des gesunden Endothels von großer Bedeutung¹⁷⁰. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass eine Verminderung der HA-Konzentration in der EZM die Glykokalyx in ihrer protektiven Funktionalität schädigt und so eine Adhäsion von Leukozyten fördert. Diese wiederum kann die Progression der Atherosklerose, welche ebenfalls einen inflammatorischen Prozess darstellt, unterstützen⁸⁵.

1.3.6 Hyaluronsäure und Fibroblasten

Nach einem Herzinfarkt spielen kardiale Fibroblasten eine entscheidende Rolle im Heilungsprozess des betroffenen Gewebes und sind für die Bildung und Umgestaltung der EZM verantwortlich. HA stellt für diesen Prozess ein wichtiges Molekül der EZM dar, welches die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten fördern kann. Dies wurde bereits im Jahre 2009 von Webber *et al.* an humanen Lungenfibroblasten nachgewiesen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass dieser Mechanismus über TGF- β 1 vermittelt wird¹⁷¹. Von Travis *et al.* wurde in Primaten gezeigt, dass HA eine Kontraktion von Kollagenfibrillen durch glatte Muskelzellen der Aorta und adventile Fibroblasten fördert. Dies führte zu einer Veränderung der Kollagenfibrillen-Organisation und der Zellform. Auch kam man hier zu dem Schluss, dass eine verstärkte Gelkontraktion und perizelluläre Anhäufung von Kollagenfibrillen durch die Bindung von CD44-Rezeptoren vermittelt wird¹⁷². 2011 zeigten Meran *et al.* die wichtige regulatorische Rolle der HA bei der TGF- β 1 abhängigen Fibroblastenproliferation¹⁷³. Es wird angenommen, dass HA die TGF- β 1 abhängige Fibroblastenproliferation durch die Förderung der Interaktion zwischen CD44 und einem EGF-Rezeptor erleichtert. Dies wiederum fördert eine spezifische intrazelluläre Signaltransduktion über den MAPK/ERK-Signalweg, der komplementär zum Smad-Signalweg wirkt und zur Zellproliferation führt¹⁷⁴.

Um das kardiale *Remodeling* nach einem Infarkt zu verstehen, darf aber die Rolle der HA und deren Auswirkung auf die Differenzierung und Proliferation der Fibroblasten nicht isoliert betrachtet werden. Entscheidend ist das Zusammenspiel mit anderen an der Heilung beteiligten Zellen, wie etwa den Immunzellen. Diese können u.a. IL-1 sezernieren, welches die TGF- β 1 vermittelte Kontraktion der Fibroblasten abschwächt¹⁷⁵. 2013 konnten Saxena *et al.* zeigen, dass die schützenden Wirkungen der IL-1-Hemmung auf eine verringerte Rekrutierung entzündungsfördernder Leukozyten und eine verringerte Aktivierung

entzündlicher und matrixabbauender Eigenschaften in Herzfibroblasten zurückzuführen sein könnten¹⁷⁵.

2013 zeigten Meran *et al.*, dass IL-1 β in Fibroblasten zur Bildung zahlreicher Strukturen, wie u.a. ICAM-1, CD44 und HAS2 führt. Diese und noch andere Veränderungen führen zu einer Immunaktivierung der Fibroblasten, was in einer erhöhten Infiltration von Monozyten in das betroffene Gewebe mündet¹⁷⁶.

1.4 Zielsetzung

Auch in Zukunft werden Herz-Kreislaufkrankungen die Haupttodesursache in Deutschland bleiben. Im Rahmen eines Myokardinfarkts kommt es zum Absterben der für die Funktionalität und Integrität des Herzmuskels essenziellen Kardiomyozyten, was wiederum Veränderungen der Reizweiterleitung und der Pumpfunktion zur Folge hat. Nicht selten versterben Patienten an einem Myokardinfarkt. Überleben diese, sind sie ein Leben lang auf Medikamente angewiesen, die einen erneuten Infarkt verhindern sollen. Die Forschung im Bereich des Myokardinfarktes ist gerade deshalb so essenziell, weil noch nicht alle Mechanismen nach Infarkt vollends erforscht wurden. Gerade die akute Phase und das *Remodeling* bedürfen weiterer Forschung, um so in Zukunft das *Outcome* und die Lebenserwartung einzelner Patienten zu verbessern.

Bereits seit vielen Jahren beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe mit der Erforschung der kardialen EZM, insbesondere der HA. Es konnte bereits 2019 gezeigt werden, dass HAS2 für die Herzheilung entscheidend ist, indem es die Aktivierung der Herzfibroblasten und das Überleben der Makrophagen fördert¹⁷⁷. Für Has3 konnte in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass diese für eine physiologische T-Zelle-Reaktion unentbehrlich und damit für die Herzheilung nach I/R wichtig ist¹⁷⁸. Nachdem Missinato *et al.* 2015 mit RHAMM einen wichtigen HA-Rezeptor als entscheidenden Faktor für die Herzregeneration im Zebrafisch entdeckt hatten¹⁴⁷ und Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zu diesem Rezeptor vielversprechende Ergebnisse lieferten, war unser Interesse geweckt, RHAMM im Kontext der kardialen Ischämie zu untersuchen. So konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass die mRNA Expression von RHAMM (*Hmmr*) bereits 48 Stunden nach I/R sehr stark erhöht ist¹⁷⁷. Das Hauptziel dieser Dissertation ist es, die Funktion von RHAMM auf den Verlauf eines akuten Herzinfarkts bei Mäusen zu untersuchen. Durch die Untersuchung der Rolle von RHAMM in der Pathophysiologie des Myokardinfarkts in einem Mausmodell sollen Einblicke in die zugrundeliegenden Mechanismen gewonnen werden, die auch für den Menschen relevant sein könnten. Ziel ist primär die Untersuchung zweier verschiedener Mauslinien und deren phänotypische Ausprägung nach Infarkt. Genutzt wurden *Hmmr*-OE und *Hmmr*-KO Mäuse, wobei diese jeweils zu ihren wildtypischen Geschwistertieren der gleichen Mauslinie verglichen wurden. Untersuchungen fanden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infarkt/Reperfusion statt und umfassten sowohl echokardiographische Untersuchungen, histologische Färbungen als auch durchflusszytometrische Untersuchungen, um die Immunantwort zu erörtern.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Alle Versuche an den verwandten Mäusen erfolgten unter Genehmigung des LANUV mit Sitz in Düsseldorf, unter den Aktenzeichen 81-02.04.2019.A12 und 81-02.04.2020.A289.

2.1.1 Tierhaltung

Sowohl die Zucht als auch die Tierhaltung und die operative Durchführung der Myokardinfarkte erfolgte in Räumen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Tiere durchliefen einen 12 Stunden Tag-/Nachtrhythmus und erhielten Wasser und Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) *ad libitum*.

Die operative Induktion der Ischämie erfolgte dabei bei allen Tieren im Alter von 8-12 Wochen. In die Versuche mit eingeschlossen wurden alle Tiere, welche eine nachweisliche ST-Streckenhebung im EKG aufwiesen, sowie gesund und an keiner weiteren Krankheit erkrankt sind.

2.1.2 Mauslinien

Für alle hier aufgeführten Experimente wurden nur männliche Mäuse der 2 verschiedene Mauslinien verwandt, die extern von der Firma *Genoway* (Lyon, Frankreich) hergestellt wurden und im Weiteren beschrieben werden. Bei der Linie 1869 handelt es sich um Mäuse, die konstitutiv alle Formen von RHAMM in allen Strukturen überexprimieren. Bei dieser Maus wurde in den *Rosa26-Locus* ein ubiquitär aktiver pCAG-Promotor eingefügt, der die Expression von *Hmmr* und dessen Reporter tdTomato antreibt, was von Beginn an zu einer sehr starken Überexpression von RHAMM in allen Zellen führt (Abbildung 6). Sowohl die heterozygot/hemizygot als auch die homozygot überexprimierenden Tiere dieser Linie weisen laut qPCR-Analyse eine signifikant höhere *Hmmr* Expression auf im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistertieren diese Linie. Die meisten Ergebnisse dieser Studie basieren auf der Verwendung der eben genannten Linie, wobei heterozygote Tiere mit ihren wildtypischen Geschwistertieren verglichen wurden. Eine makroskopische Besonderheit dieser Linie ist, dass sowohl die heterozygoten als auch die homozygoten Tiere ein pinkes Pankreas aufweisen, nicht jedoch die wildtypischen Kontrolltiere. Diese haben ein normal weißes Pankreas.

Des Weiteren wurde auch die Linie 1893 verwandt. Dabei handelt es sich um Mäuse, bei denen RHAMM konstitutiv in allen Geweben deletiert ist, sogenannte *Knockout*-Mäuse. Die homozygoten *Knockout*-Mäuse dieser Linie weisen laut qPCR-Analyse eine signifikant

verringerte *Hmmr* Expression (verwendet wurde der linke Ventrikel des Herzens) im Vergleich zum Wildtyp dieser Linie auf.

Zur Generierung der *Hmmr*-KO Mäuse wurden die Exons 8 bis 10 herausgeschnitten. Exon 7 und 11 wurden aneinandergefügt, wodurch eine Rasterverschiebung mit Entstehung einer *Out-of-Frame* Mutation resultiert, was in der Bildung eines STOP- Codons in Exon 11 mündet (interner *Genoway* Report zur Mauslinie; nicht publiziert). Die genetischen Informationen, die hinter Exon 11 liegen, liefern die verschiedenen RHAMM-Varianten. Durch die Deletion kann ein nicht funktionales Transkript entstehen oder, bei dennoch stattfindender Translation, die Bildung eines Proteins ohne HA-Bindestelle. In der qPCR-Analyse wiesen die *Hmmr*-KO-Mäuse eine signifikant geringere *Hmmr* Expression im Vergleich zum Wildtyp dieser Linie auf (Abbildung 6). In den unten beschriebenen Experimenten wurden homozygote KO-Mäuse mit deren wildtypischen Geschwistertieren verglichen.

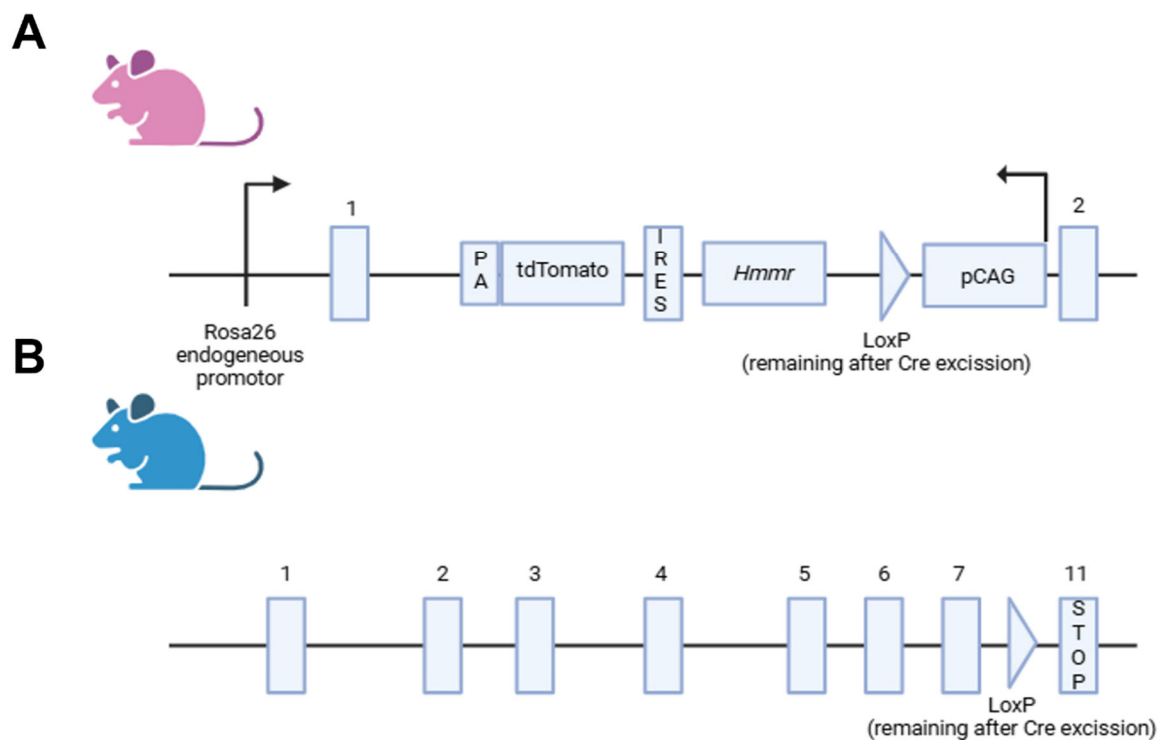


Abbildung 6: Darstellung der Generierung von globalen *Hmmr*-OE und *Hmmr*-KO Mäusen. A, Bei dieser Maus wurde in den Rosa26-Lokus ein CAG Promotor eingefügt, der die Expression von *Hmmr* und tdTomato antreibt, was zu einer sehr starken Überexpression von RHAMM in jeder Zelle führt. **B,** Deletion der Exons 8-10, sodass im Exon 11 ein STOP-Codon resultiert. Abbildung erstellt mit *BioRender.com*¹⁷⁹.

2.1.3 Induktion der Ischämie und Reperfusion

Damit *in vivo* vergleichbare und reproduzierbare Myokardinfarkte möglich sind, wurden diese operativ durch Frau Dr. Simone Gorressen unter konstanten Bedingungen operativ induziert und die hämodynamischen Parameter erhoben.

Der gesamte Prozess gliedert sich dabei in 3 Teile: der Anlage einer Ligatur, der Ischämie und der Reperfusion. Im Folgenden wird auf die einzelnen operativen Maßnahmen detaillierter eingegangen.

2.1.3.1 Anlage der Ligatur

Die Ligatur wurde in Vorbereitung 3 Tage vor der eigentlich stattfindenden Ischämie und Reperfusion angelegt. Der zeitliche Abstand dieser beiden Prozesse ermöglicht eine Trennung der entstehenden Stimuli. Zum einen wird bei Anlage der Ligatur der Thorax eröffnet und somit ein Entzündungsprozess in Gang gesetzt, welcher von Prozessen, die durch die Ischämie/Reperfusion in Gang gesetzt werden, unterschieden werden muss. Ein weiterer Faktor ist, dass so die Ischämie/Reperfusion bei geschlossenem Thorax stattfinden kann. Dies kommt den physiologischen Bedingungen des Myokardinfarktes beim Menschen näher als eine Induktion bei geöffnetem Thorax.

Um die Ligatur anzulegen, wurden die Tiere zunächst durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (90 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (15 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Im Anschluss wurden die Tiere mittels Venenverweilkanüle intubiert und auf einem beheizbaren OP-Tisch fixiert, um die Körpertemperatur von 38 °C aufrechtzuerhalten. Dies wurde ständig über ein rektales Thermometer überprüft. Beatmet wurden die Tiere während der OP mittels sauerstoffangereicherter Raumluft mit einem Verhältnis von 2/3 Luft und 1/3 Sauerstoff und 2 % V/V Isofluran (Forene®, Abbott GmbH, Deutschland). So konnte eine Narkose für die Zeit der OP gewährleistet werden. Das Tidalvolumen bzw. Atemzugvolumen der Beatmung betrug 10 µL/g Körpergewicht bei einer Frequenz von 140 Schlägen pro Minute.

Im ersten Schritt der OP wurde der Thorax im 4. Interkostalraum, zwischen der 3. und 4. Rippe, eröffnet und an der linken vorderen absteigenden Arterie (*left anterior descending arterii* = LAD) mittels 7-0 Prolene Faden locker umschlungen. Beide Enden des Fadens wurden dann durch einen 1mm dicken Polyethylen-Ring mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm hindurchgeführt und außerhalb des Thorax geführt.

Der Thorax sowie die Muskeln wurden mit 4/0 Seide verschlossen. Anschließend wurden die zwei Enden des 7-0 Prolene Fadens miteinander verknotet und auf der rechten Seite des Thorax im subkutanen Gewebe fixiert. Im letzten Schritt wurde nun die Haut unter Verwendung eines 5-0 Prolene Fadens vernäht.

Nun konnte die Inhalationsnarkose beendet werden und nach Einsatz des Atemreflexes die Extubation durchgeführt werden. Die Tiere wurden bis zur vollständigen Erholung warmgehalten und erhielten zur Analgesie Buprenorphin.

2.1.3.2 Induktion der Ischämie mit nachfolgender Reperfusion

Wie bereits oben erwähnt, erfolgte die Induktion der Ischämie 3 Tage nach Anlage der Ligatur.

Narkotisiert werden die Tiere hier in einer Kammer durch eine Mischung aus sauerstoffangereicherter Raumluft (im Verhältnis 1/3) und Isofluran (2 % V/V). Im Anschluss erfolgen eine Maskenbeatmung und die Fixierung auf einem beheizbaren OP-Tisch unter rektaler Kontrolle der Körpertemperatur. Beatmet werden die Tiere mit derselben Mischung mit derer sie narkotisiert wurden. Um nun den Erfolg der Ischämie messen zu können, wurden zusätzlich Elektroden angelegt, wodurch ein Elektrokardiogramm (EKG) aufgenommen und die Herzfrequenz gemessen werden konnte.

Um die Ischämie durchzuführen, das heißt die Perfusion zu unterbrechen, wurden die Fäden, die durch die Anlage der Ligatur subkutan im Gewebe platziert wurden, nach außen geführt. Hierzu musste die Haut zunächst eröffnet werden. An die Fäden wurden dann Gewichte von 10g gehangen. Dies ist notwendig, damit alle Infarkte miteinander vergleichbar und reproduzierbar sind. So wurde in jeden Fall die LAD mit der gleichen Kraft verschlossen. Die Perfusion wurde für insgesamt 45 Minuten unterbrochen. Eine erfolgreiche Ischämie konnte durch Aufzeichnung einer ST-Streckenhebung im EKG (*Acquisition Software*, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) beobachtet werden.

Nach Ablauf der 45 Minuten wurde eine Reperfusion durch das Durchschneiden der Fäden und damit dem Abfallen der Gewichte eingeleitet. Die Haut wurde wiederum unter Verwendung von 5-0 Prolene Fäden vernäht. Auch hier erhielten die Tiere eine postoperative Analgesie durch Buprenorphin.

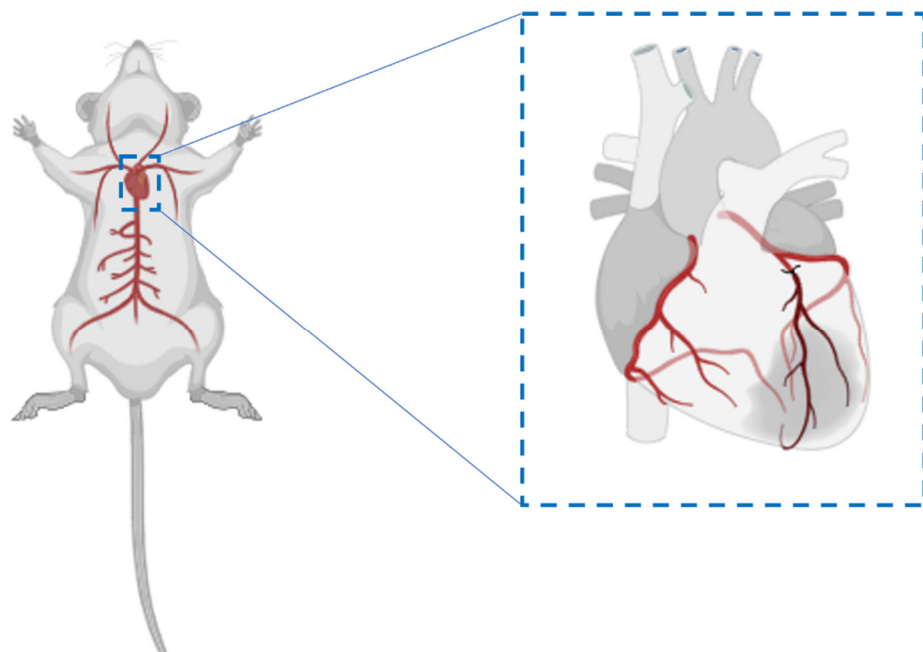


Abbildung 7: Darstellung der Myokardialen Ischämie untere Abbildung der *left anterior descending artery* (LAD). Abbildung erstellt mit *BioRender.com*¹⁷⁹.

2.1.4 Echokardiografie

Um die kardiale Funktion zu bestimmen, wurden sowohl 1 Woche vor I/R-Induktion, als auch 24h, 1 Woche, 2 Wochen und 3 Wochen nach Infarkt echokardiografische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden die Tiere mittels Isofluran (2 % V/V) narkotisiert. Dadurch werden Angst und das Abwehrverhalten bei den Tieren verhindert und so vergleichbare und reproduzierbare Untersuchungen ermöglicht.

Vor Beginn der echokardiografischen Untersuchung wurde der Thorax mittels Haarentfernungscreme enthaart und das *Aquasonic Gel 100* wurde auf Körpertemperatur vorgewärmt. Die Tiere werden bei der Untersuchung auf ein beheizbares Elektroden-Kontakt-Pad gelegt, welches bei den Tieren eine konstante Körpertemperatur garantiert und die Aufnahme der Herzfrequenz (HF) und des EKG ermöglicht. Die Aufnahme der kardialen Funktionsparameter erfolgte parasternal entlang der kurzen und langen Achse des linken Ventrikels. Dabei wird der Schallkopf über dem *Apex* platziert, was im *M-Mode* eine 4-Kammersicht und eine Beurteilung des Blutflusses durch die Mitralklappe ermöglicht. So können Funktionsparameter wie *EF*, *LVEF*, *ESV* und *EDV* bestimmt werden. Die echokardiografischen Untersuchungen erfolgten durch Frau Dr. Simone Gorressen.

Alter an Tag 0: 8-12 Wochen

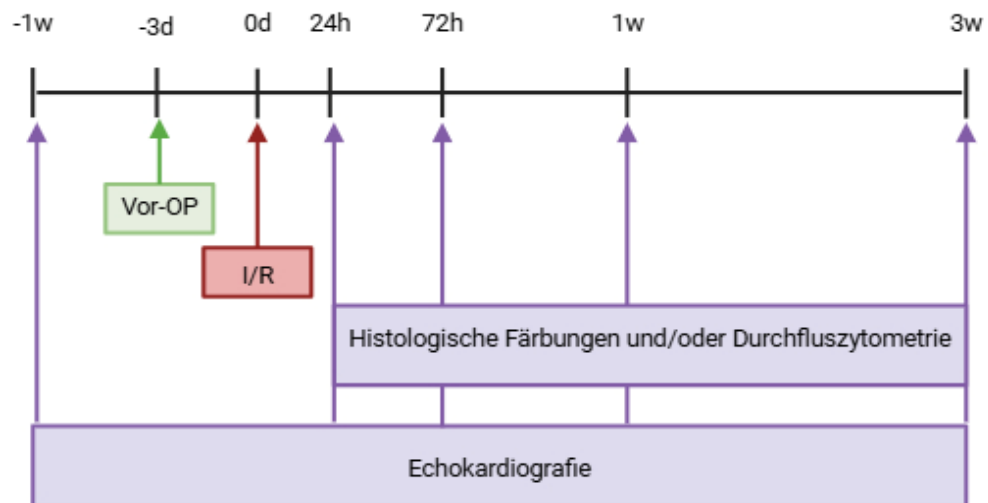


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Versuche und deren Zeitpunkte. Die Ischämie/Reperfusion (I/R) erfolgte schematisch an Tag 0, wobei die Tiere hier 8-12 Wochen alt sind. Echokardiografische Untersuchungen wurden 1 Woche vor I/R und jeweils 24 Stunden (24h), 72 Stunden (72h), 1 Woche und 3 Wochen nach I/R durchgeführt. Die Vor-OP erfolgte 3 Tage vor I/R. Histologische Färbungen und/oder durchflusszytometrische Versuche wurden 24h, 72h, 1 Woche und 3 Wochen nach Infarkt durchgeführt.

2.2 Validierung der *Hmmr* Überexpression bzw. des *Knockouts*

Zum Nachweis der unterschiedlichen Proteinmengen an RHAMM wurden Western-Blots sowohl für *Hmmr*-OE und *Hmmr*-KO, als auch für deren wildtypischen Geschwistertiere

durchgeführt. Verwandt wurde der linke Ventrikel von Herzen 72h nach Infarkt. So konnte, neben der qPCR-Analyse, der Erfolg der genetischen Veränderung quantifiziert werden. Der Versuchsaufbau gliedert sich in mehrere Teile, die nachfolgend detailliert beschrieben werden. Die Versuche sowie deren Auswertung erfolgten in Kooperation mit Herrn Dr. Florian Funk.

2.2.1 Herstellung der linksventrikulären Herz-Homogenate

Zur Herstellung der linksventrikulären Herz-Homogenate wurde Mäusen 72h nach Infarkt das Herz aus dem Thorax entnommen und anschließend der linke Ventrikel vom restlichen Herzen abgetrennt. Dieser linke Ventrikel wurde dann bei -80 °C bis zur Verwendung aufbewahrt. Dazu wurde das Gewebe in je 1 mL 0.9 % NaCl überführt, welche bereits mit einem Protease Inhibitor und einem Phosphatase Inhibitor versetzt war (HALT™, Thermo Scientific). Darauffolgend wurde das Herzgewebe auf höchster Stufe mechanisch zerkleinert (Ultra-Turrax® T10 Basic, Ika®). Im nächsten Schritt wurde das Homogenat bei 15.000 G und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert, damit sich unlösliche Zellbestandteile abtrennen. Darauffolgend wurde der Überstand einmal mit Lämmli-Puffer versetzt und konnte so für die Western-Blot Analyse verwendet werden. Separat dazu wurde für die Messung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (Pierce® BCA Assay Kit, Thermo Scientific) ein Teil des Überstandes 1:10 mit Wasser verdünnt. Weiterhin wurde ein Rest Überstand als Backup aufgehoben.

2.2.2 Proteindetektion mittels Western-Blot (Immunoblot)

Die Proteine des Lysats wurden auf einem 10 %igen Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Immobilon-P Polyvinyliden Difluorid (PVDF) Membran (Millipore) übertragen. Dazu wurde eine konstante Spannung von 100 V für eine Stunde angelegt. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurde die Membran mit 0,5% Milch/TBS-T blockiert (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20, and pH 7.6, SNAP i.d.® 2.0, Millipore). Die Membran wurde über Nacht und schwenkend bei 4 °C mit dem Erstantikörper (Cell signaling mAb E7S4Y, 1:5000 in 5 % mild/TBS-T) in einer Verdünnung von 1:5000 in 5 % Milchpulver in TBS-T inkubiert. Reaktive Banden wurden durch Chemolumineszenz unter Verwendung des *Horseradish*Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpers (abcam) und Immobilon® Forte Western HRP-Substrat (Millipore) nachgewiesen.

Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 4-mal mit 30mL TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 5 mL Zweitantikörper für 10 Minuten inkubiert, wobei im Anschluss erneut 4-mal mit 30 mL TBS-T gewaschen wurde. Darauffolgend wurde die Membran in ein Gefäß mit ECL-Reagenz (*Immobilon forte*, Millipore) überführt und 1 Minute geschwenkt. Schließlich konnten Bilder mit Hilfe des CCD Kamera Systems digitalisiert und quantifiziert werden. Die Analyse erfolgte mit der Software *ChemStudio*, *VisionWorks* von Analytik Jena. Eine Liste der zugehörigen Reagenzien, Antikörper und Verbrauchsmaterialien ist in Tabelle 1 zu finden.

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Methode

Wie unter 2.2.1 beschrieben, kann das gewonnene Homogenat in einer Verdünnung von 1:10 zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Methode genutzt werden (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Katalognummer: 23225). Im verwandten Kit herrscht ein alkalisches Milieu, wobei die vorherrschenden Proteine unter Anwesenheit des Moleküls $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Tatrat}$ mit zweifach positiv geladenen Kupfer Ionen (Cu^{2+}) einen Chelatkomplex ausbilden. Im nächsten Schritt kommt es dabei zu einer Reduktion der Kupfer Ionen, sodass diese dann einfach positiv geladen (Cu^{1+}) vorliegen. Anschließend bilden zwei BCA-Moleküle (*Bicinchoninic Acid*) mit eben diesen einfach positiv geladenen Kupfer Ionen einen hydrophilen Chelatkomplex, der optisch von einer violetten Färbung gekennzeichnet ist. Das Absorptionsmaximum dieses Chelatkomplexes liegt bei einer Wellenlänge von 562nm und kann unter Zuhilfenahme einer Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration fotometrisch bestimmt werden. Zur Herstellung eben dieser Standardreihe nutzt man bovines Serumalbumin (BSA).

Für die Messung werden die Proben in einem 96-well-Format mittels Mikroplattenreader (Synergy™ MX microplate reader, BioTek®) bei einer definierten Wellenlänge von 562 nm vermessen. Die Konzentrationen wurden anschließend aus diesen Messwerten ermittelt. Dabei wurden sowohl die unverdünnten Proben als auch die mit Lämmli-puffer versetzten Proben berücksichtigt. Eine Liste der zugehörigen Reagenzien, Antikörper und Verbrauchsmaterialien ist in Tabelle 1 zu finden.

Tabelle 1: Reagenzien Western-Blot etc. (Puffer, Antikörper, Verbrauchsmaterialien)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Laufpuffer	3g Tris 14,4 g Glycin 1 g SDS ad 1000 mL	Nicht kommerziell
Lysepuffer	10 mM Tris (pH 8,0) 0,5 mM EDTA 0,5% Triton-X-100 0,1 % Desoxycholsäure 0,1% SDS 140 mM NaCl	Nicht kommerziell
100x Phosphataseinhibitor-Mix	200 mM Imidazol 400 mM Na ⁺ -K ⁺ -Tatrat 500 mM NaF	Nicht kommerziell
Lysepuffer für Herzgewebe	Lysepuffer Phosphataseinhibitor-Mix PMSF (0,1 mM Endkonz.) Benzamidin (10 mM Endkonz.)	Nicht kommerziell
3x Lämmli-puffer	1,5 mg Bromphenolblau 0,6 g SDS 3 mL Glycerol 3,9 mL Tris (50 mM, pH 6,8) ad 10 mL	Nicht kommerziell
1x Western blot Transferpuffer	100 mL 10x Transferpuffer 700 mL H ₂ O 200 mL Methanol	Nicht kommerziell
10x Transferpuffer	15,15 g Tris 56,25 g Glycin	Nicht kommerziell

2.3 Infarktgrößenbestimmung mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)- Färbung

24 Stunden nach Reperfusion wurden die Tiere getötet und das Herz wurde für die Messung der Infarktgröße entnommen. Zunächst wurde dieses unter Verwendung einer 0,9 %igen Kochsalzlösung gespült und die LAD wurde wieder verschlossen. Im Anschluss wurde ein 4 % Evans-Blau-Farbstoff in die Aortenwurzel injiziert, um die *Area at risk* (AAR) vom übrigen Myokard abzugrenzen. Im nächsten Schritt wurde das Herz in eine durchsichtige Kühlfolie gewickelt und 1 Stunde lang bei -20 °C gelagert. Dann wurde das Gewebe parallel zur atrio-ventrikulären Furche in 1 mm dicke Scheiben geschnitten, wobei jeder Schnitt gewogen wurde. Diese wurden für je 5 Minuten lang bei 37 °C mit 1 % 2,3,5- Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung inkubiert, um lebensfähige und nekrotische Abschnitte der AAR identifizieren zu können. 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid stellt die oxidierte Form dar, welche von lebenden Zellen in Formazan durch einen Elektronentransfer reduziert wird. Die Bereiche des Infarkts, der AAR und des nicht-ischämischen Bereiches des linken Ventrikels wurden mit computergestützter Planimetrie (Diskus-Software; Hilgers, Königswinter, Deutschland) in Kooperation mit Frau Dr. Simone Gorressen durchgeführt und ausgewertet.

2.4 Passive Kraftmessung an isolierten Kardiomyozyten

Zur Durchführung der passiven Kraftmessung nach I/R wurden Kardiomyozyten von *Hmmr*-OE Mäusen und deren wildtypischen Geschwistertieren aus dem linken Ventrikel 72 Stunden und 3 Wochen nach I/R untersucht. Die Versuche sowie deren Auswertung erfolgen in Kooperation mit Herrn Dr. Sebastian Kötter des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie des Universitätsklinikums in Düsseldorf.

Für die passiven Spannungsmessungen wurden Mauskardiomyozyten isoliert. Dafür wurden aus Biopsien kleine Gewebeproben (3-5 mg) aus dem gefrorenen Muskelgewebe entnommen und in eine Relaxationslösung überführt, welche sich wie folgt zusammensetzt: 7,8 mM ATP, 20 mM Kreatinphosphat, 20 mM Imidazol, 4 mM EGTA, 12 mM Magnesium-Propionat, 97,6 mM K-Propionat (pH 7,0), 30 mM 2,3-Butandionmonoxim (BDM), 1 mM Dithiothreitol (DTT), 100 mM Proteaseinhibitorcocktail sowie 50 mM Phosphataseinhibitorcocktail.

Diese Gewebeproben wurden im Anschluss mittels Überkopfrührer bei 750 U/min homogenisiert. Die Suspension wurde im Folgenden in einer Minizentrifuge 3 Sekunden lang zentrifugiert, resuspendiert und 3 Minuten lang in einer Relaxationslösung, die zusätzlich mit 3 % Triton-X-100 angereichert war, permeabilisiert. Es folgte ein Waschen der Myozyten durch drei Zentrifugationsschritte mit Relaxationslösung ohne Triton-X-100, um das davor zugeführte Detergens zu entfernen. Die fertige Myozytensuspension wurde bis zur weiteren experimentellen Verwendung auf Eis aufbewahrt. Für die Messungen der passiven Kraft wurden einige Mikroliter der Kardiomyozytensuspension auf ein Deckglas übertragen, das auf ein inverses Phasenkontrastmikroskop (*Nikon eclipse Ti*) montiert wurde. Eine einzelne Zelle wurde ausgewählt und zwischen einem piezoelektrischen Motor und einem Kraftaufnehmer (403A, Aurora Scientific) befestigt, die beide mit einer Mischung (Verhältnis 1:1) aus Silikonkleber (*Dow Corning Glue 3145-transparent*) und einem optischen Klebstoff (*Northland Optical Adhesive 63*) bedeckt waren. Die Zellen wurden dann ausgehend von der Ruhesarkomerlänge (durchschnittlich 1,8 μm) in fünf Schritten bis zu einer maximalen Sarkomerlänge (SL) von 2,3 μm gedehnt. Im Bereich der Sarkomerlänge von 2,0 - 2,2 μm ist Titin der Hauptfaktor für die passive Steifigkeit¹⁸⁰. Zwischen den Dehnungen wurde eine kurze Haltezeit von 10 Sekunden eingelegt, um die Stressrelaxation abzuwarten. Nach der letzten Dehnungsperiode wurden die Kardiomyozyten wieder in die Ausgangslänge entlassen, um mögliche Verschiebungen der Basiskraft zu testen. Während des Dehnungsprotokolls wurde die Länge der Sarkomere mit einer IMPERX (CCD)-Kamera (*Aurora Scientific*) aufgezeichnet. Anhand der Aufzeichnungen wurde die Kraft am Ende jeder Halteperiode analysiert. Die passive Kraft wurde auf die Querschnittsfläche ("passive Spannung") bezogen, die anhand des Durchmessers der Kardiomyozyten bestimmt wurde. Jede Zelle wurde mindestens 3-mal mit einem Abstand von 2 Minuten zwischen den Messungen gemessen. Diese passive Kraft wurde für je 5-7 Zellen pro Gewebe vermessen für die Zeitpunkte 72h und 3 Wochen nach I/R.

2.5 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Analysen, auch FACS (Fluorescence activated cell scanning) Analysen genannt, werden zur Charakterisierung von Immunzellen angewandt. Analysiert wurden diese im Blut der Mäuse, sowie der Milz, des Herzens und des Knochenmarks. Vor Verwendung der Gewebe muss aus diesen, nach Entnahme aus der Maus, eine Einzelzellsuspension generiert werden. Anschließend werden diese Zellen nach Antikörperfärbung im LSR Fortessa Durchflusszytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) vermessen. Bestimmen kann man die absoluten Zellzahlen mit Hilfe der Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter Inc., Krefeld, Deutschland). Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der FlowJo™ Software (BD Franklin Lakes, NJ, USA). **Vollständige Gating-Schemata aller durchgeführten Analysen finden sich im Appendix.**

Tabelle 2: Antikörper für durchflusszytometrische Untersuchungen

Antikörper	Klon	Hersteller
Ly6G - BV785	1A8	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD64 (FcγRI) - BV711	X54-5/7.1	BioLegend, San Diego, CA, USA
I-A/I-E (MHCII) - BV650	M5/114.15.2	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD45 - BV605	30-F11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CCR2 (CD192) - BV421	SA203G11	BioLegend, San Diego, CA, USA
LYVE1 - AF488	ALY7	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
MERTK (Mer) - PE/Cy7	2B10C42	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD11b - PEDazzle	M1/70	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ly6C - APCCy7	HK1.4	BioLegend, San Diego, CA, USA
Tim4 - AF647	RMT4-54	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD11b - BV711	M1/70	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD45 - BV421	30-F11	BioLegend, San Diego, CA, USA
ITAG7 - FITC	334908	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CD31 - PECy7	390	BioLegend, San Diego, CA, USA
FEEDER - APC	mEF-SK4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD16/32 - unkonjugiert	93	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD4 - AF647	GK1.5	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ly6G - BV650	1A8	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD8a - PerCP5.5	53-6.7	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ly6C - AF488	HK1.4	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD3 - APCCy7	17A2	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD19 - PacBI	6D5	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD115 - BV711	AFS98	BioLegend, San Diego, CA, USA
Annexin-V	N/A	BioLegend, San Diego, CA, USA
Live/Dead Aqua	N/A	Life Technologies, Eugene, OR, USA

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Erythrozyten Lyse-Puffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA	Eigene Herstellung
PEB Puffer	2 mM EDTA	Eigene Herstellung

	0,5 % BSA in DPBS	
Heparin/DPBS	0,4 % Heparin (5000 I.E./mL) in DPBS	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Isotoner FACS Puffer	BD FACS Flow Trägerflüssigkeit	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Enzymatische Verdauungslösung	549 U/mL Kollagenase I 60 U/mL DNase I in HBSS	Eigene Herstellung
Hank's balanced salt solution (HBSS)	1,26 mM CaCl ₂ 0,49 mM MgCl ₂ 0,41 mM MgSO ₄ 5,3 mM KCl 0,44 mM KH ₂ PO ₄ 4,17 mM NaHCO ₃ 137,39 mM NaCl 0,34 mM NaH ₂ PO ₄ 5,55 mM Glukose	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien

2.5.1 Blut

Um die Immunzellen im Blut analysieren zu können, muss das Blut direkt nach der Entnahme aus der Maus mit EDTA antikoaguliert werden. Im Experiment 24h nach Infarkt wurden die Mäuse 10 Minuten vor der Tötung heparinisiert, wodurch die Antikoagulation mit EDTA überflüssig wurde.

Im ersten Schritt wurden die Fc-Rezeptoren mit CD16/32-Antikörpern für 10 Minuten bei 4 °C blockiert, um unspezifische Antikörperadsorptionen zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einer Mischung verschiedener Antikörper zur Markierung der jeweiligen Zellpopulationen für 15 Minuten bei 4 °C. Anschließend werden die Erythrozyten mit Erythrozyten-Lysepuffer, einem hypotonischen Puffer, für 7 min bei 4 °C inkubiert und lysiert. Anschließend werden die Proben bei 800 G und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in PEB resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann vermessen und die verschiedenen Immunzellpopulationen in ihrer Zellzahl pro μL Blut dargestellt. Eine Liste der zugehörigen Antikörper ist in Tabelle 2 enthalten und die verwendeten Puffer und Lösungen in Tabelle 3.

2.5.2 Milz

Um die Immunzellpopulationen der Milz untersuchen zu können, muss zunächst eine Einzelzellsuspension hergestellt werden. Dazu wird die Milz nach der Entnahme aus der Maus in ein „Purple Miltenyi Tube“ unter Zugabe von 3 mL PEB überführt. Mit Hilfe eines *gentleMACS* Dissoziators (*Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurde das Gewebe zerkleinert und anschließend durch einen Nylonfilter mit einer Porengröße von 70 μm filtriert. Dieses Filtrat wurde anschließend bei 300 G und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in PBS resuspendiert. Die Fc-Rezeptoren der

Zellen in dieser Suspension wurden zunächst mit CD16/32-Antikörpern für 10 Minuten bei 4 °C blockiert, um unspezifische Antikörperadsorptionen zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen mit LIVE/DEAD™ *fixable aqua* (Life Technologies, Eugene, OR, USA) für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Dies ermöglicht die Markierung toter Zellen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 Minuten bei 800 G und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in PEB aufgenommen. Nun erfolgte die Inkubation für 15 Minuten bei 4 °C mit einer Mischung verschiedener Antikörper, die die jeweiligen Zellpopulationen markieren sollten. Anschließend werden die Erythrozyten mit Erythrozyten-Lysepuffer, einem hypotonischen Puffer, für 7 min bei 4 °C inkubiert und lysiert. Anschließend werden die Proben bei 800 G und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in PEB resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann vermessen und die verschiedenen Immunzellpopulationen in ihrer Zellzahl pro mg Milzgewebe dargestellt. Eine Liste der zugehörigen Antikörper ist in Tabelle 2 enthalten und die verwendeten Puffer und Lösungen in Tabelle 3.

2.5.3 Knochenmark

Um das Knochenmark einer Maus zu isolieren, wurden beide Hinterbeine vom Rest des Körpers abgetrennt. Haut und Muskelgewebe wurden sorgfältig entfernt, und die Gelenke des Oberschenkelknochens und des Schienbeins wurden herausgeschnitten. Die insgesamt 4 Knochenteile wurden dann mit steriler PBS unter Verwendung einer 26G-Kanüle gespült. Die so erhaltene Suspension wurde anschließend durch einen Nylonfilter mit einer Porengröße von 100 µm filtriert. Dieses Filtrat wurde dann bei 300 G und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in PBS resuspendiert. Die Fc-Rezeptoren der Zellen in dieser Suspension wurden zunächst mit CD16/32-Antikörpern für 10 Minuten bei 4 °C blockiert, um unspezifische Antikörperadsorptionen zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen mit LIVE/DEAD™ *fixable aqua* (Life Technologies, Eugene, OR, USA) für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert, um tote Zellen zu markieren. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 Minuten bei 800 G und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in PEB aufgenommen. Nun erfolgte die Inkubation für 15 Minuten bei 4 °C mit einer Mischung verschiedener Antikörper, die die jeweiligen Zellpopulationen markieren sollten. Anschließend werden die Erythrozyten mit Erythrozyten Lyse-Puffer, einem hypotonischen Puffer, für 7 min bei 4 °C inkubiert und lysiert. Anschließend werden die Proben bei 800 G und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in PEB resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann vermessen, und die verschiedenen Immunzellpopulationen wurden in ihrer Zellzahl als absolute Anzahl beider Hinterbeine dargestellt. Eine Liste der zugehörigen Antikörper ist in Tabelle 2 enthalten und die verwendeten Puffer und Lösungen in Tabelle 3.

2.5.4 Herz

10 Minuten vor der Entnahme des Herzens wurde der Maus Heparin injiziert, um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern. Nach der Blutentnahme aus dem Herzen wurde zunächst der linke Ventrikel und dann der rechte Ventrikel insgesamt 3 Minuten lang mit kaltem, sterilem DPBS gespült. Anschließend wurde das Herz aus dem Thorax entnommen und sowohl die Vorhöfe als auch die Herzklappen entfernt. Die Ventrikel wurden dann mit einer Schere auf Eis zu Quadern von bis zu 1 mm Größe zerkleinert. Der Aufschluss erfolgte bei 37 °C für 20 Minuten mit Kollagenase I (600 U/mL) und DNase I (60 U/mL in HBSS mit Ca^{2+} und Mg^{2+}). Die so erhaltene Suspension wurde durch einen Nylonfilter mit einer Porengröße von 100 µm filtriert. Dieses Filtrat wurde erneut durch einen Nylonfilter mit einer Porengröße von 40 µm filtriert. Dieses Filtrat wurde 10 Minuten lang bei 800 G und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 7 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde PBS zugegeben, um die Lyse zu unterbrechen, und die Suspension bei 800 G und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in PBS aufgenommen. Auch hier wurden die Fc-Rezeptoren mit CD16/32-Antikörpern für 10 Minuten bei 4 °C blockiert, um unspezifische Antikörperadsorptionen zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen mit LIVE/DEAD™ *fixable aqua* (Life Technologies, Eugene, OR, USA) für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert, um tote Zellen zu markieren. Durch Färbung mit verschiedenen Antikörperkombinationen konnten anschließend verschiedene Immunzellpopulationen identifiziert werden, wobei die gemessenen Zellzahlen in Zellen pro mg Herzgewebe angegeben wurden. Eine Liste der verwendeten Antikörper findet sich in Tabelle 2 und die verwendeten Puffer und Lösungen in Tabelle 3.

2.6 Organentnahme sowie Histologische und Immunhistochemische Analysen

Für die histologischen und immunhistochemischen Analysen wurden ausschließlich Herzen verwandt. Nach Ablauf der Ischämie und unter Einhaltung der jeweiligen Reperusionszeiten von 24 Stunden, 72 Stunden, 1 Woche oder 3 Wochen wurden die Tiere schmerzfrei getötet. Das Herz wurde mittels einer 24G-Kanüle von Sterican® (BRAUN) am rechten Vorhof punktiert und anschließend aus dem Thorax entfernt. Das so gewonnene Blut wurde mittels EDTA antikoaguliert und dessen Plasma isoliert und bei -80 °C gelagert.

Nach Entnahme des Herzens wurde dieses zunächst mittels DPBS von Blutrückständen befreit und anschließend für 24 Stunden bei 4 °C in einer 4 % Formaldehydlösung (ROTI® Histofix 4 %, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Im Folgenden wurden die Herzen in PBS überführt und über eine aufsteigende Ethanolreihe und Roticlear® (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) vollautomatisch entwässert und in Paraffin eingebettet.

Diese eingebetteten Herzen wurden dann mittels Rotationsmikrotom (RM2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) in 5 µm dicke Scheiben geschnitten. Dabei umfasst eine

Ebene eine Dicke von 350 µm. Die ersten 100 µm wurden konsekutiv mit 2 Schnitten pro Objektträger, auf insgesamt 10 Objektträger aufgezogen. Die folgenden 250 µm wurden dann verworfen. Das Ganze wurde pro Herz für 10 Ebenen wiederholt, sodass am Ende 100 Objektträger mit insgesamt 200 Schnitten für Färbungen zur Verfügung standen. Begonnen wurden die Schnitte jeweils am Apex hin zur Basis.

Bevor diese Schnitte verwandt werden konnten, wurden diese über Nacht an der Luft getrocknet und im Anschluss für 2 Stunden bei 60 °C im Ofen fixiert.

Vor jeder Färbung wurden die Objektträger zunächst entparaffiniert. Dazu wird 3-mal für je 15 Minuten in Roticlear® (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany) inkubiert. Anschließend erfolgte jeweils eine Inkubation für je 2 bzw. 5 Minuten in Ethanol absolut, Ethanol 95 % und Ethanol 70 %. Gefolgt wurde die Rehydratisierung von 2-mal 5 Minuten Waschen in PBS. Eine Zusammenstellung aller verwendeten Puffer und Lösungen für histologische und immunhistologische Färbungen ist in Tabelle 4 dargestellt. Sollte die Inkubationszeit von dieser Vorgehensweise bei bestimmten Färbungen abweichen, wird dies unter der jeweiligen Methode erwähnt.

Tabelle 4: Verwendete Lösungen und Puffer für histologische Färbungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
PBS	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 1.5 mM KH ₂ PO ₄ 8.3 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4)	Nicht kommerziell
ABC-Puffer	1,33 g Na-Acetat 3 H ₂ O 0,3 g NaCl Bovines Serumalbumin (BSA) 1mg/mL 0,6 g Tris	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TE Puffer	50mM Tris 1 mM EDTA 0,5% Triton X pH 8,0	Nicht kommerziell
Antigendemaskierung	Zitratpuffer (pH 6,0; 10x) 1:10	ZytoVision GmbH Bremerhaven, Deutschland
Antigendemaskierung	Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
1% BSA	1 g BSA in 100 mL PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Blockierlösung	20 mM Tris 137 mM NaCl 10 % (V/V) FCS	Nicht kommerziell

	1 % (m/V) BSA	
Biotin-Avidin-Blocking System	Nach Herstellerangaben	BioLegend
Chondroitinase	2 U/100 µl, verdünnt in ABC Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hyaluronidase	Hyaluronidase 100 U/ml 1:25 verdünnt	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gomori Färbelösung	0,4 % (m/V) Chromotrop 2 R 0,3 % (m/V) Anilinblau 1 % (V/V) Eisessig 0,8 % Phosphorwolframsäure in destilliertem Wasser	Nicht kommerziell
Celestine Blau Lösung	5 % (m/V) $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 % (m/V) Celestine Blau 14 % (V/V) Glycerol in destilliertem Wasser	Nicht kommerziell
Picro-Siriusrot Lösung	0,1 % (m/V) Siriusrot in gesättigter Pikrinsäurelösung	Nicht kommerziell

In Tabelle 5 sind alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Verdünnungen und Hersteller für die immunhistochemischen Färbungen gelistet

Tabelle 5: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
Kaninchen anti-CD68	1:500	ab125212	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Kaninchen anti-COMP	1:50	abcam ab231977	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Kaninchen anti-CCN2	1:100	abcam ab227180	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Kaninchen anti-Mensch-CCN5	1:100	LS-Bio LS-B15830	LSBio
Kaninchen-Anti-Maus-Decorin	1:100	LF113	ThermoFischer
Kaninchen anti-Col6a1	1:100	abcam ab182744	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Kaninchen anti-Col5a1	1:100	abcam ab7046	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Kaninchen anti-Dermatopontin	1:100	Proteintech 10537-1-AP	Proteintech
Ziege anti-Kaninchen AF647	1:200	A-21245	Life Technologies, Eugene, OR, USA
Biotinyliertes HAbP	1:200	385911	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin, Cy3 konjugiert	1:200	SA1010	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.6.1 Gomori-Trichrom Färbung

Für die Färbung nach Gomori wurden pro Herz jeweils alle 10 Ebenen verwandt. Diese wurden zunächst wie unter 2.6 entparaffiniert und dann rehydratisiert. Zu Beginn wurden die Schnitte 2-mal für je 15 Minuten in Roticlear® inkubiert und anschließend je 5 Minuten in Ethanol absolut, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol und *Aqua dest.* inkubiert.

Nachfolgend fand eine Inkubation in Bouin's Lösung (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) in einem 58 °C warmem Wasserbad für 15 Minuten statt, um das Gewebe ideal auf die nachfolgende Färbung vorzubereiten. Danach erfolgte ein 5-minütiges Spülen unter fließendem Leitungswasser. Anschließend fand eine 5-minütige Inkubation in Weigerts Eisen Hämatoxylin A+B 1:1 (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) statt, wobei auch hier nach erfolgter Inkubation die Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten gespült wurden. So erfolgte eine Anfärbung der Zellkerne. Dann wurden die Schnitte für 25 Minuten in dem Farbgemisch Gomoris-Lösung inkubiert und im Anschluss kurz unter Leitungswasser gespült. Danach wurde 2-mal für je 2 Minuten in 0,5 %iger Essigsäure differenziert, ehe die Schnitte dehydratisiert und eingedeckt werden konnten. Dies erfolgte für je 2 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe und 2-mal je 5 Minuten in Roticlear®. Mit ROTI®Mount wurden die Deckgläschen schließlich fixiert. Muskelgewebe erscheint durch diese Färbung rot, Zellkerne schwarz und kollagenhaltige Matrix blau. Die Auswertung der Schnitte erfolgte mittels ZEN 3.8.

2.6.2 Picro-Siriusrot Färbung

Für die Färbung mittels Picro-Siriusrot wurden alle 10 Ebenen verwandt. Wie auch oben unter 2.6 beschrieben, wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydratisiert. Es folgte eine 1-minütige Inkubation in destilliertem Wasser, ehe die Schnitte für 7 Minuten in Celestineblau inkubiert wurden. In diesem Schritt wurden die Zellkerne angefärbt. Nach erfolgter Inkubation erfolgte ein zweifaches kurzes Eintauchen der Schnitte in 1 %igem HCl zur Differenzierung. Im Anschluss wurden die Schnitte für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und dann für 30 Minuten in der Picorsiriusrot Färbelösung inkubiert. Ehe die Schnitte nun eingedeckt werden konnten, wurden diese dehydratisiert mittels Inkubation für je 2 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 % Ethanol über 96 % Ethanol und Ethanol absolut. Nach 5-minütiger Inkubation in Roticlear®, können die Deckgläschen schließlich mit ROTI®Mount auf den Schnitten fixiert werden. Kollagenhaltige Matrix erscheint rot, Zellkerne blau und gesundes Herzgewebe gelb. Aufgenommen wurden Bilder sowohl im Durchlicht als auch im linear polarisierten Licht. Im Durchlicht erscheint gesundes Myokard gelb, während infarziertes bzw. geschädigtes Myokard rot erscheint. Bilder, die im Durchlicht aufgenommen werden, können zur Ermittlung der Narbengröße herangezogen werden.

Im linear polarisierten Licht macht man sich nun eine besondere Eigenschaft von Sirius Rot zu Nutze, und zwar der Doppelbrechung. Dabei kann man zwischen dicht und locker gepackten Kollagenfasern unterscheiden. Während dicht gepackte Kollagenfasern/Fibrillen rot erscheinen, stellen sich locker gepackte Kollagenfasern/Fibrillen grün dar. Bilder, die im linear polarisierten Licht aufgenommen wurden, können für die Auswertung der Packungsdichte und des Kollagengehaltes herangezogen werden. Die Auswertung erfolgte in *ImageJ*.

2.6.3 Immunhistochemische Färbungen

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und rehydratisiert. Im Anschluss erfolgte eine Antigendemaskierung mittels 20-minütiger Inkubation in heißem Zitratpuffer und dem 0,08 %igen Zusatz von Tween20. Der Zusatz von Tween20 dient hier zur Permeabilitätssteigerung der Zellmembran. Dieser Schritt findet bei der Anfärbung von COMP jedoch nicht statt. Hier erfolgte die Antigendemaskierung mittels 10-minütigem Verdau durch Proteinase K. Auch für die Anfärbung von Decorin und Hyaluronsäure gibt es Besonderheiten bzw. kleine Abweichungen vom allgemeinen Protokoll, die unten genau beschrieben werden. Nach erfolgter Antigendemaskierung erfolgt ein zweimaliger jeweils 5 Minuten andauernder Waschschrift mittels PBS gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation in Blockierlösung (Zusammensetzung s. Tabelle 4). Im Anschluss erfolgte die nächtliche Inkubation des Primärantikörpers bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte 2-mal je 5 Minuten mittels PBS gewaschen und anschließend für 1 Stunde mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Auch danach wurden die Schnitte erneut 2-mal je 5 Minuten mittels PBS gewaschen. Abschließend wurde das Gewebe mittels FluorCare® DAPI eingedeckt woraufhin die Herzen dann direkt im Anschluss mikroskopiert werden konnten.

2.6.3.1 Kollagen VA1-Färbung

Zur Detektion von Kollagen des Subtyps VA1, erfolgte die Färbung mittels Kaninchen anti-ColVA1 Antikörper (Abcam ab7046) und die Detektion mit einem zweiten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, der mit AF647 konjugiert war.

2.6.3.2 Kollagen VIA1-Färbung

Zur Detektion von Kollagen des Subtyps VIA1, erfolgte die Färbung mittels Kaninchen anti-ColVIA1 Antikörper (Abcam ab182744) und die Detektion mit einem zweiten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, der mit AF647 konjugiert war.

2.6.3.3 Färbung des Bindegewebswachstumsfaktors CTGF bzw. CCN2

Zur Detektion von CTGF, auch bekannt als CCN2, erfolgte die Färbung mittels Kaninchen anti-CTGF Antikörper (Abcam ab227180) und die Detektion mit einem zweiten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, der mit AF647 konjugiert war.

2.6.3.4 Färbung des WNT1-induzierbares Signalweg-Protein 2 (WISP-2 bzw. CCN5)

Zur Detektion von WISP-2, auch bekannt als CCN5, erfolgte die Färbung mittels Kaninchen anti-WISP-2 Antikörper (LS-Bio LS-B15830) und die Detektion mit einem zweiten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, der mit AF647 konjugiert war.

2.6.3.5 Färbung des Matrixproteins Dermato pontin

Zur Detektion von Dermato pontin (DPT) wurde erfolgte die Färbung mittels Kaninchen anti-Dermato pontin Antikörper (Proteintech 10537-1-AP) und die Detektion mit einem zweiten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, der mit AF647 konjugiert war.

2.6.3.6 CD68-Färbung zur Detektion von Makrophagen

Zur Detektion von Makrophagen wurde CD68 als Antigen verwandt. Die Färbung erfolgte hier mit einem Kaninchen-CD68-Antikörper (Abcam ab125212) und die Detektion mit einem zweiten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, der mit AF647 konjugiert war.

2.6.3.7 Färbung des Matrixproteins Decorin

Für den Nachweis von Decorin (DCN) musste etwas anders vorgegangen werden. Nach erfolgter Antigendemaskierung wurden die Schnitte mittels Chondroitinase verdaut, um die Chondroitinketten zu entfernen. Der Verdau erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C. Im Anschluss wurden die Schnitte dann 2-mal für je 5 Minuten mittels PBS gewaschen und dann für 1h in der oben beschriebenen Blockierlösung inkubiert. Im Anschluss wurde das Decorin mittels Kaninchen anti-Decorin Antikörper (LF113) Primärantikörper angefärbt und die Detektion mit einem zweiten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, der mit AF647 konjugiert war.

2.6.3.8 Anfärbung des *Cartilage oligomeric matrix protein* (COMP)

Wie oben bereits erwähnt kommt es auch bei dieser Färbung zu einer kleinen Abweichung vom Standardprotokoll. Hier diente als Antigenretrival kein Zitratpuffer, sondern eine 10-minütige Inkubation mittels Proteinase K (20 µg/ml). Für den Nachweis von COMP erfolgte die Färbung mittels Kaninchen anti-COMP Antikörper (Abcam ab231977) und die Detektion mit einem zweiten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, der mit AF647 konjugiert war.

2.6.3.9 Hyaluronsäure-Färbung

Auch hier wurde zunächst analog zum Standardprotokoll verfahren. Nach erfolgter Antigendemaskierung mittels Zitratpuffer und zweimaligem Waschen mittels PBS wurde das

endogene Biotin im Gewebe für 10 Minuten mittels Avidin und 10 Minuten mittels Biotin blockiert. Die Hyaluronsäure-Färbung erfolgte hier jedoch nicht mittels Antikörper, sondern mithilfe eines biotinylierten HA bindenden Proteins (HAbP). Im Anschluss wurde wieder analog zum allgemeinen Protokoll verfahren. Als Sekundärantikörper diente hier Cy3-konjugiertes Streptavidin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

2.7 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software *GraphPad Prism* 10.1.2 (*GraphPad Software Inc.*, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Für alle Datensätzen wurde der ROUT Ausreißer Test (Q=1%) angewandt. Statistische Ausreißer wurden so berechnet und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurden alle Datensätze mittels *Shapiro-Wilk*-Test auf eine Normalverteilung hin überprüft. Beim Vergleich zweier normalverteilter Gruppen wurde ein ungepaarter zweiseitiger t-Test angewendet. Beim Vergleich zweier nicht normalverteilter Datensätze wurde der sogenannte *Mann-Whitney*-Test durchgeführt.

Zur Auswertung von mehr als zwei Experimentalgruppen wurde eine Varianzanalyse mittels *OneWay* ANOVA durchgeführt. Zum Vergleich mehrerer Gruppen über einen Zeitverlauf wurde die *TwoWay* ANOVA angewandt. Bei allen Tests wurde ein *p-Value* von $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Die n-Anzahl repräsentiert jeweils einzelne Tiere bzw. Gewebe aus unabhängigen *in vivo* Experimenten.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der Mausmodelle mittels Western Blot

Zur Validierung der unterschiedlichen Genotypen in unserer Studie wurde, wie unter 2.2 beschrieben, ein Western-Blot durchgeführt. Verwendet wurden dazu die linken Ventrikel der jeweiligen Genotypen 72 Stunden nach I/R. Um Unterschiede in der Proteinmenge besser detektieren zu können, wurden Herzen nach kardialer Ischämie gewählt. Der Grund dafür ist, dass basal in den Wildtyp-Tieren (WT) nahezu kein RHAMM nachweisbar wäre und damit kein Unterschied zu den *Hmmr*-KO Mäusen gezeigt werden könnte. Da man weiß, dass RHAMM nach MI hochreguliert ist und dessen mRNA Expression 48 Stunden nach I/R sein Maximum erreicht¹⁸¹, wurde hier dieser Zeitpunkt gewählt. Man erkennt, dass RHAMM auch hier in den wildtypischen Tieren 72 Stunden nach MI deutlich detektierbar ist. Für die globalen *Hmmr*-OE Mäuse erkennt man eine deutlich intensivere Bande, welche in etwa 28-mal intensiver ist als die der WT Mäuse. Für die *Hmmr*-KO Mäuse lässt sich kein Signal detektieren (Abbildung 9).

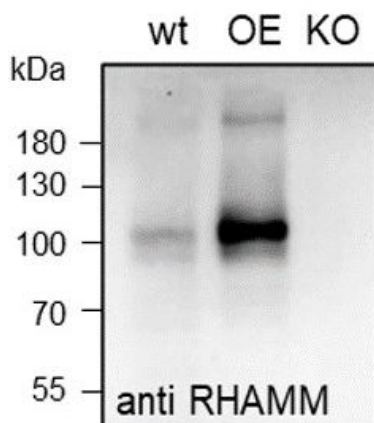


Abbildung 9: Aufnahme der Validierung mittels Western Blot. Verwendet wurde der linke Ventrikel 72 Stunden nach I/R. Zur Detektion von RHAMM wurde der Antikörper *Cell signaling* mAB E7S4Y in einer Verdünnung von 1:5000 genutzt auf einem 10%igen Gel. N=1,1,1. Die Erhebung dieser Daten erfolgte durch Dr. Florian Funk.

3.2 Auswertung der Herzgewichte

Bedingt durch einen Myokardinfarkt kommt es zu zahlreichen Umstrukturierungen des Myokards. Die Folge kann eine Herzinsuffizienz mit einer Hypertrophie des Herzmuskels sein. Aus diesem Grund wurde zu jedem geernteten Zeitpunkt das Herzgewicht und Körpergewicht dokumentiert. Zu keinen Zeitpunkten ergaben sich Unterschiede, auch nicht in dem Verhältnis des Herzgewichtes zum Körpergewicht in den *Hmmr*-OE Mäusen (Daten nicht gezeigt).

3.3 Echokardiografische Untersuchung der Herzfunktion

Nach einem Myokardinfarkt ergeben sich durch die Veränderungen in der Struktur des Herzgewebes auch Änderungen in der Herzfunktion. Durch den Ersatz des gesunden

Myokards durch kollagenhaltige Strukturen ist der Herzmuskel in seiner Funktion eingeschränkt. Das Ausmaß kann mittels echokardiografischer Messungen ermittelt werden. Vor und auch nach I/R wurden so gemäß Abbildung 8 und wie unter 2.1.4 beschrieben echokardiografische Untersuchungen vorgenommen und ausgewertet. Dies geschah sowohl für die *Hmmr*-OE als auch *Hmmr*-KO Mäuse. Im Ergebnis konnten wir für die globalen *Hmmr*-OE Mäuse zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in der Herzfunktion detektieren (Abbildung 10). In den globalen *Hmmr*-KO Mäusen hingegen sehen wir 3 Wochen nach Infarkt eine signifikante Abnahme in der Ejektionsfraktion. Das Herzzeitvolumen ist hingegen zu allen gemessenen Zeitpunkten nach Infarkt signifikant reduziert (Abbildung 11).

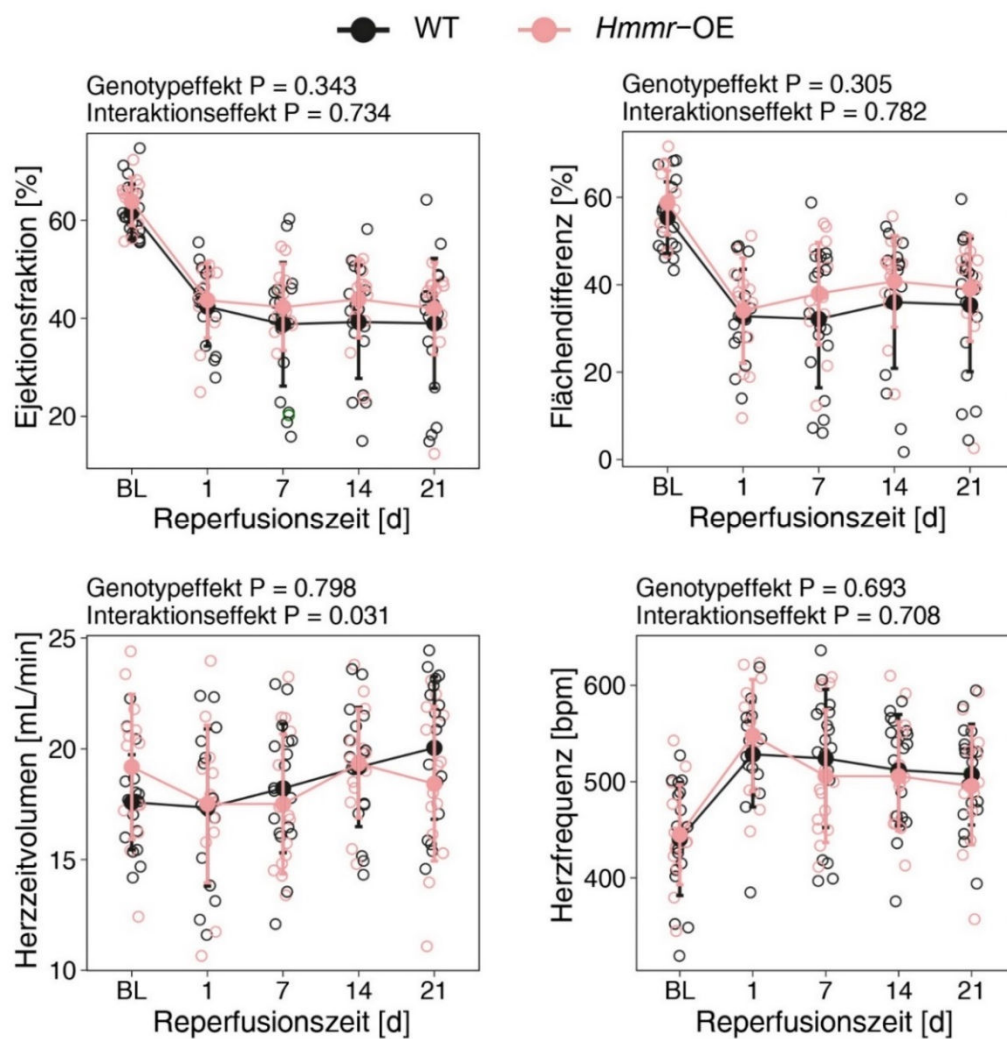


Abbildung 10: Bestimmung der Herzfunktion von *Hmmr*-OE Tieren mittels EKG. Gemessen wurde basal, 24 Stunden, 1 Woche, 2 Wochen und 3 Wochen nach I/R. *Two-way mixed ANOVA*, mehrfache paarweise Vergleiche zwischen den Genotypen zu jedem Zeitpunkt mit Bonferroni-Korrektur, n = 15-18, 13-14. Die Erhebung dieser Daten erfolgte durch Dr. Simone Gorressen.

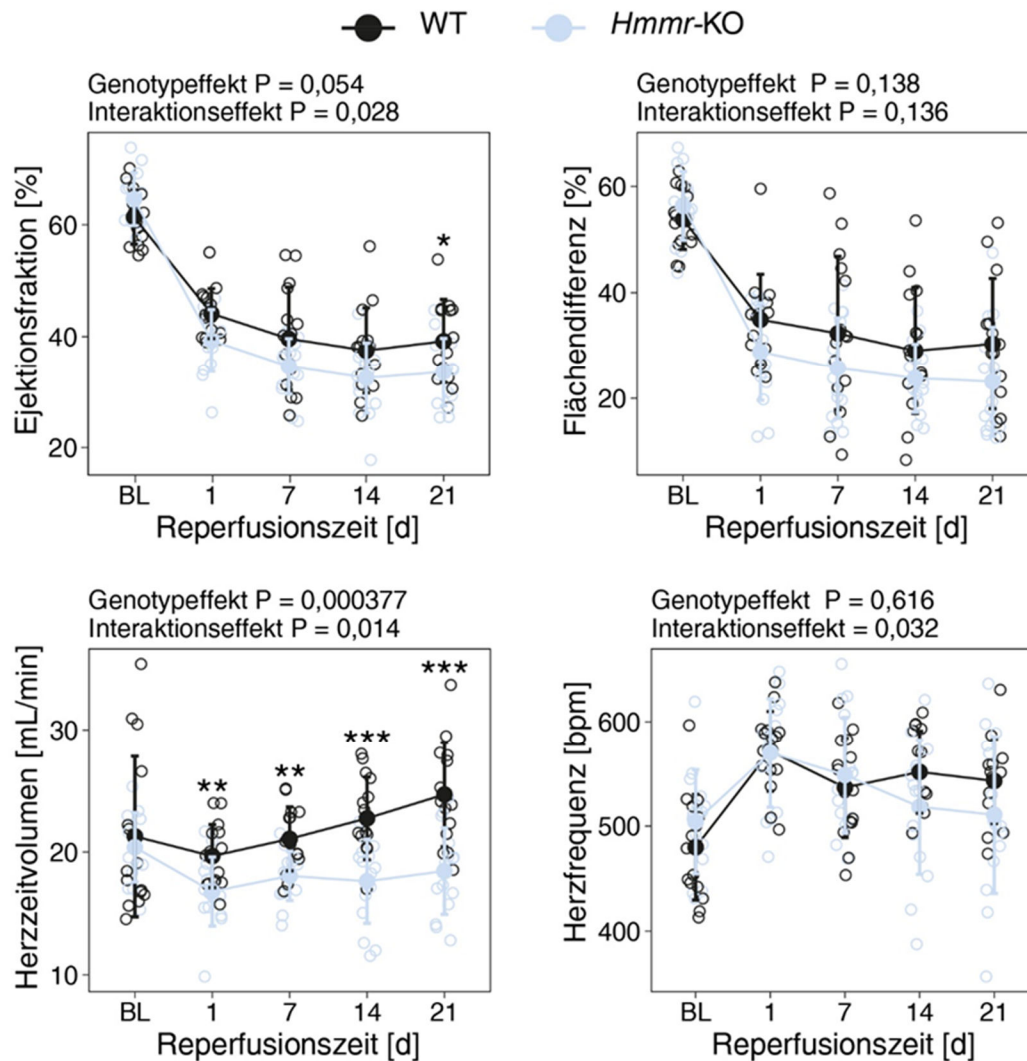


Abbildung 11: Bestimmung der Herzfunktion von *Hmnr*-KO Tieren mittels EKG. Gemessen wurde basal, 24 Stunden, 1 Woche, 2 Wochen und 3 Wochen nach I/R. Zweifach gemischte ANOVA, mehrfache paarweise Vergleiche zwischen den Genotypen zu jedem Zeitpunkt mit Bonferroni-Korrektur, $n = 15, 15$, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$. Die Erhebung dieser Daten erfolgte durch Dr. Simone Gorressen.

3.4 TTC

Wie unter 2.3 beschrieben wurde eine Bestimmung der Infarktgröße des linken Ventrikels mittels einer TTC-Färbung durchgeführt. Dies erfolgte in Kooperation mit Frau Dr. Simone Gorressen und Herrn Dr. Dominik Semmler. Mit Hilfe dieser Methode soll der Anteil an toten Zellen mittels Redox-Reaktion und anschließender photometrischer Bestimmung vermessen werden. Diese Redox-Reaktion kann nur in lebenden Zellen erfolgen. Sowohl für die *Hmnr*-OE Mäuse (Abbildung 12) als auch für die *Hmnr*-KO Mäuse (Abbildung 13) waren keine Unterschiede ersichtlich.

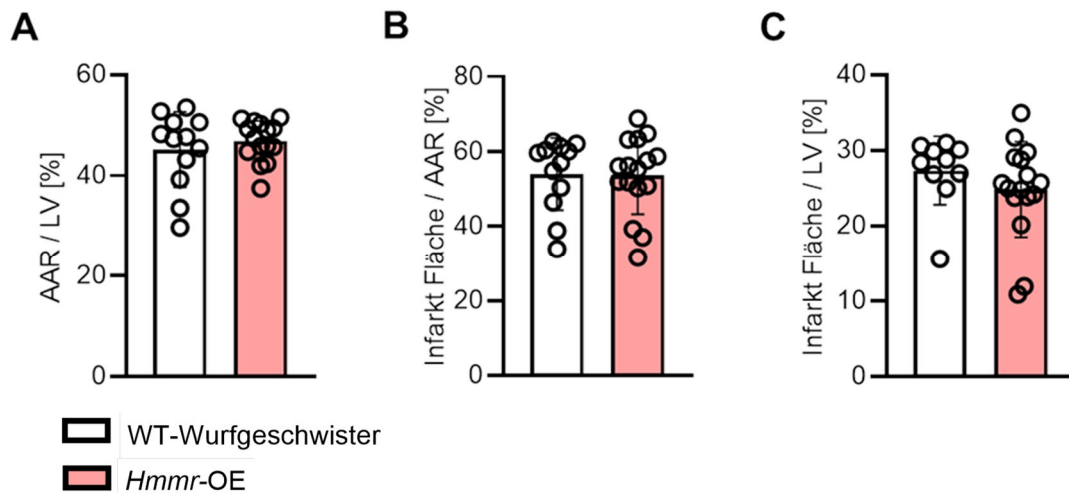


Abbildung 12: Infarktgrößen Bestimmung mittels TTC-Färbung von WT- und Hmnr-OE Mäusen 24 Stunden nach I/R. A, pro linkem Ventrikel (LV). **B**, infarzierte Fläche pro AAR. **C**, infarzierte Fläche pro LV; *Mann-Whitney*-Test, $n = 12, 16$. Die Erhebung dieser Daten erfolgte durch Dr. Simone Gorressen.

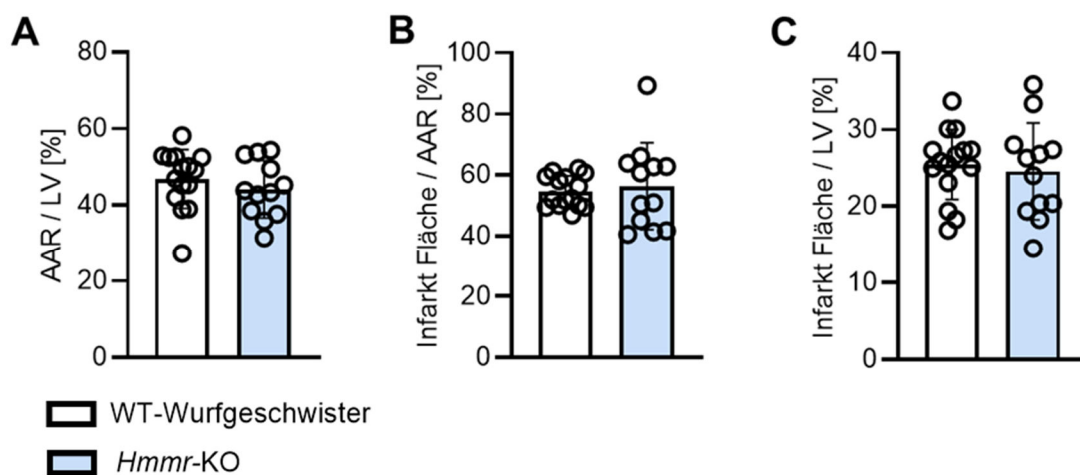


Abbildung 13: Infarktgrößen Bestimmung mittels TTC-Färbung von WT- und Hmnr-KO Mäusen 24 Stunden nach I/R. A, pro linkem Ventrikel (LV). **B**, infarzierte Fläche pro AAR. **C**, infarzierte Fläche pro LV; *Mann-Whitney*-Test, $n = 15, 12$. Die Erhebung dieser Daten erfolgte durch Dr. Simone Gorressen.

3.5 Histologische Ermittlung der Narbengröße und des Kollagengehalts

In der initialen Phase des Forschungsprojekts wurden die Herzen 3 Wochen nach Infarkt wie unter 2.6.1 beschrieben anhand der Gomori-Trichrom Färbung analysiert. Mit Hilfe dieser Färbemethode kann der Infarktphänotyp und die Narbengröße ermittelt werden. Dies geschah für zwei unterschiedliche Genotypen: einmal für die *Hmnr*-OE Mäuse sowie für die *Hmnr*-KO Mäuse. Dabei stellt sich die Narbe blau dar und hebt sich somit optisch vom gesunden, rosa/magenta-farbenen Gewebe ab. Die Auswertung findet händisch mit Hilfe des Programms

ZEN statt. Interessanterweise zeigen die *Hmmr*-OE Mäuse eine signifikant kleinere Narbe (Abbildung 14).

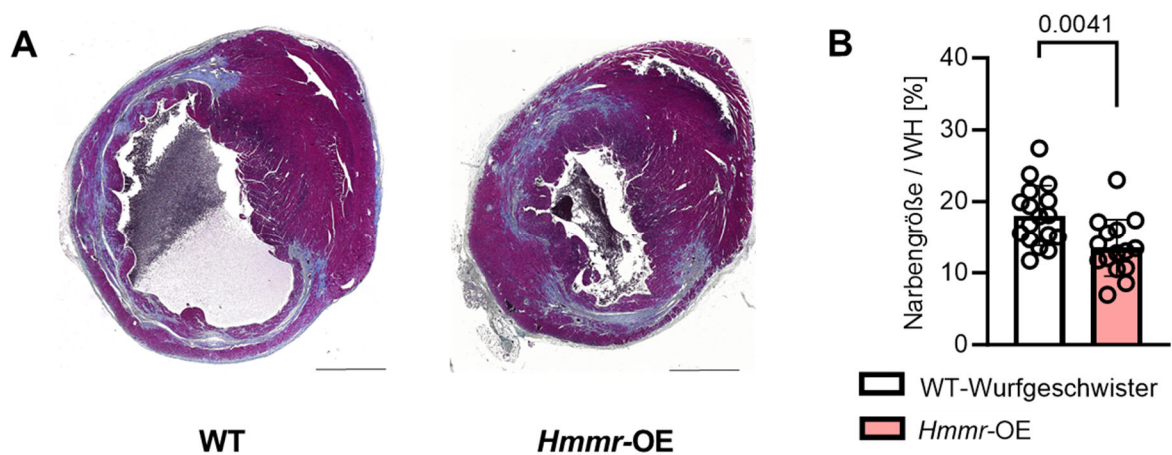


Abbildung 14: Eine globale Überexpression von RHAMM (*Hmmr*) führt zu einer verringerten Narbengröße 3 Wochen nach kardialer Ischämie/Reperfusion (I/R). Gomori Trichrome Färbung zur Ermittlung der Narbengröße an Herzen von *Hmmr*-OE und wildtypischen Geschwister (WT). Histologisch stellt sich gesundes Gewebe rötlich/magenta dar, während Narbengewebe sich durch die blau-graue Färbung optisch davon abhebt. Die Bilder wurden mittels ZEN 3.8 ausgewertet. **A**, Repräsentative Bilder der gefärbten Herzen beider Genotypen. **B**, Ermittelte Narbengröße über zehn Ebenen. Angabe als Flächenprozent des gesamten Herzes (WH), der Maßstabsbalken entspricht 1000 μ m. Darstellung als Mittelwert \pm SD; Signifikanzen wurden mit Hilfe des ungepaarten t-Test ermittelt; $n=17,15$; $**p<0,01$.

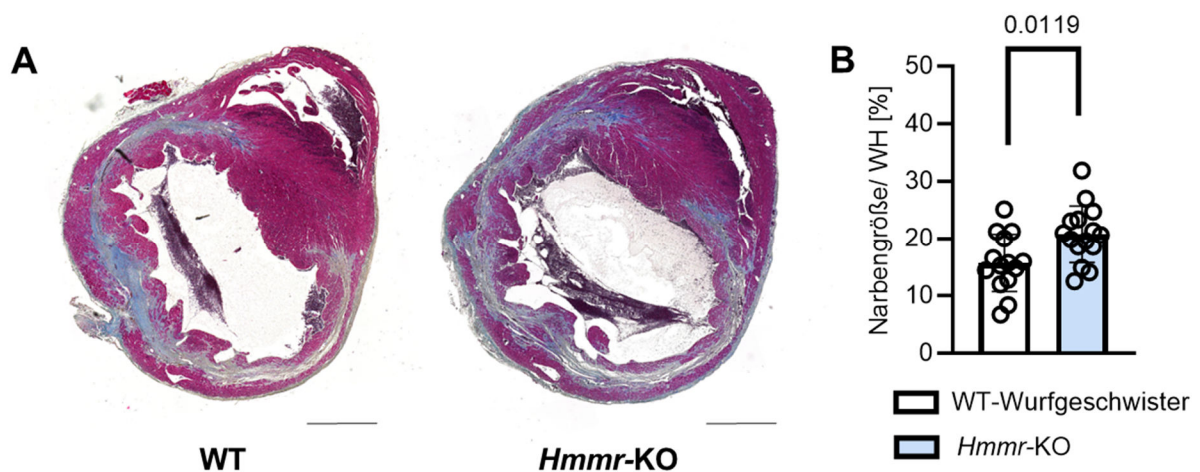


Abbildung 15: Ein globaler Knockout von RHAMM (*Hmmr*) führt zu einer vergrößerten Narbe 3 Wochen nach kardialer Ischämie/Reperfusion (I/R). Gomori Trichrome Färbung zur Ermittlung der Narbengröße an Herzen von *Hmmr*-KO und wildtypischen Geschwister (WT). Histologisch stellt sich gesundes Gewebe rötlich/magenta dar, während Narbengewebe sich durch die blau-graue Färbung optisch davon abhebt. Die Bilder wurden mittels ZEN 3.8 ausgewertet. **A**, Repräsentative Bilder der gefärbten Herzen beider Genotypen. **B**, Ermittelte Narbengröße über zehn Ebenen. Angabe als Flächenprozent des gesamten Herzes (WH), der Maßstabsbalken entspricht 1000 μ m. Darstellung als Mittelwert \pm SD; Signifikanzen wurden mit Hilfe des ungepaarten t-Test ermittelt; $n=14,15$; $**p<0,01$.

Die *Hmmr*-KO Mäuse zeigen einen genau entgegengesetzten Phänotyp. Es zeichnet sich hier eine signifikant größere Narbe im gesamten Herzen verglichen zu deren wildtypischen Geschwistertieren ab (Abbildung 15).

Im nächsten Schritt wurde wie unter 2.6.2 beschrieben eine Picro-Siriusrot Färbung zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Für die *Hmmr*-OE Mäuse fand dies 24 Stunden, 72 Stunden, 1 Woche und 3 Wochen nach Infarkt statt, für die *Hmmr*-KO Mäuse 1 Woche und 3 Wochen nach Infarkt. Bei der Sirius Rot Färbung handelt es sich um eine spezifische histologische Färbung, wodurch kollagenhaltige Strukturen unter dem Mikroskop sichtbar werden. Dabei lagert sich das große *Sirius Red F3B* Molekül spezifisch, aufgrund seiner negativen Ladung, an kollagenhaltige Fasern an. Aufgenommen werden die Bilder dabei sowohl im Durchlicht – hier stellt sich die Narbe rot dar und hebt sich somit optisch vom gesunden, gelben Gewebe ab – sowie im polarisierten Licht – hier stellen sich dicht gepackte kollagenhaltige Fasern rot, locker gepackte kollagenhaltige Fasern grün und Überlagerungen beider gelb/orange dar. Ausgewertet wurden die Bilder halbautomatisch mittels *Image J* und eines Macros.

Für die *Hmmr*-OE Mäuse sieht man 24 Stunden, 72 Stunden und 1 Woche nach Infarkt keine signifikanten Unterschiede in der Narbengröße. Lediglich 3 Wochen nach Infarkt konnte erneut eine signifikant kleinere Narbe ermittelt werden und bestätigt somit die Ergebnisse der Gomori-Trichrome Färbung aus Abbildung 14 (Abbildung 16).

Auch die Packungsdichte der Kollagenfasern wurde untersucht. Dazu wurde das Verhältnis der roten – also dicht gepackten Kollagenfasern – zu denen der grünen – also der locker gepackten Kollagenfasern – ermittelt. Ein Verhältnis über 1 zeigt somit mehr rote Kollagenfasern an und unter 1 ergeben sich durch ein Mehr an grünen Kollagenfasern. Für die *Hmmr*-OE Mäuse zeigten sich zu allen 4 untersuchten Zeitpunkten im Zeitverlauf keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 17).

Betrachtet man den Kollagengehalt insgesamt, so zeichnet sich 1 Woche nach Infarkt eine Tendenz zu mehr Kollagen in den *Hmmr*-OE Mäusen ab. 3 Woche nach Infarkt kehrt sich diese Tendenz dann um, sodass die *Hmmr*-OE Mäuse zu diesem Zeitpunkt sogar signifikant weniger Kollagen vorweisen (Abbildung 18).

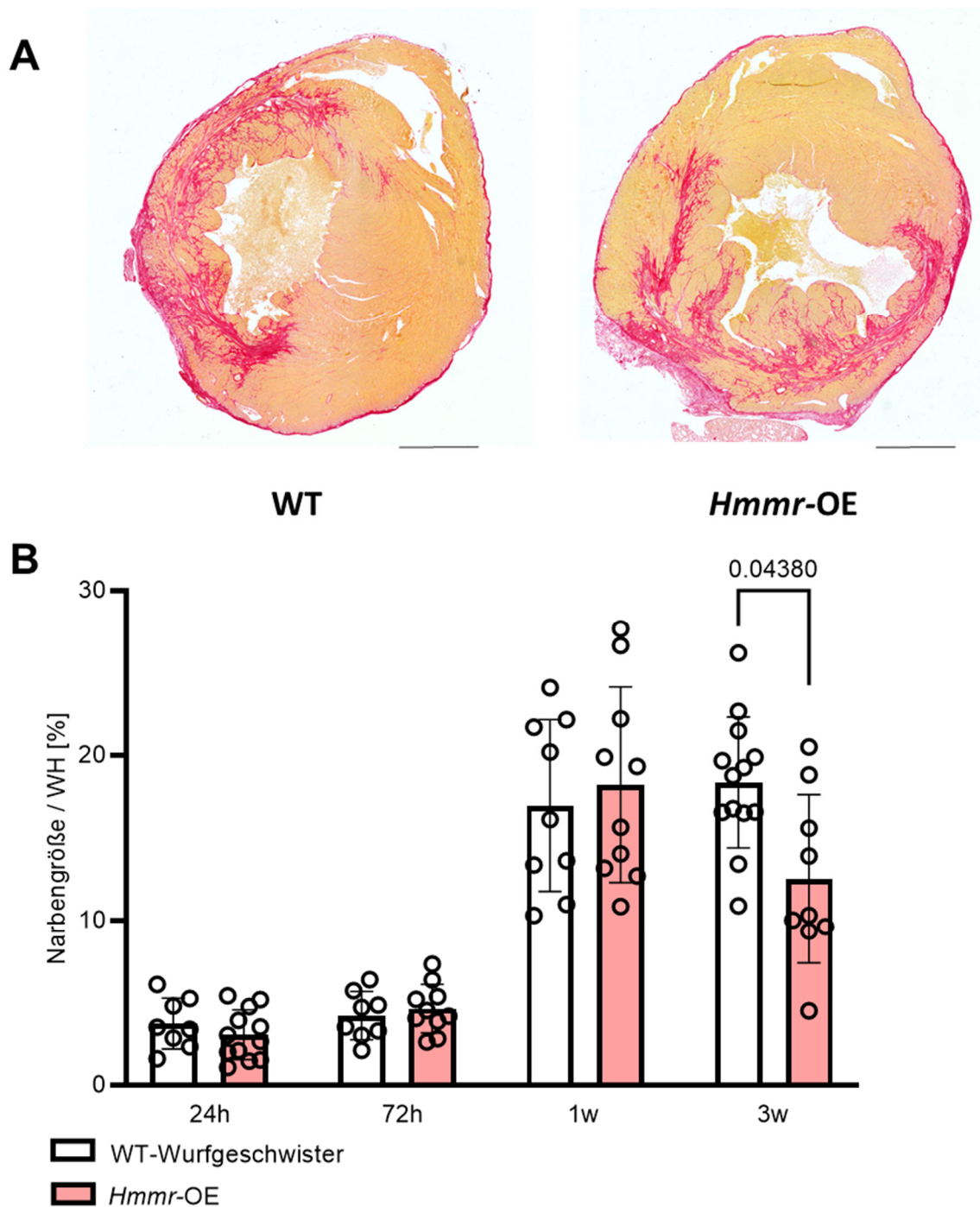


Abbildung 16: Bestimmung der Narbengröße mittels Picro-Siriusrot Färbung der Hmnr-OE Mäuse. Sowohl 24 Stunden (24h), 72 Stunden (72h), 1 Woche (1w) und 3 Wochen (3w) nach I/R wurden Herzen mittels Picro-Siriusrot Färbung im Hinblick auf den Infarktphänotyp histologisch untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Kollagen erscheint im Durchlicht rot, während gesundes Gewebe gelb erscheint. **A**, Repräsentative Bilder 3 Wochen nach I/R, Ebene 5. **B**, Darstellung der Narbengröße zu den genannten Zeitpunkten. Angefärbt wurden jeweils 10 Ebenen pro Herz, angegeben sind die Werte als Flächenprozent des gesamten Herzens (WH). Der Maßstabsbalken entspricht 1000 μ m. Darstellung als Mittelwert \pm SD; Signifikanzen wurden mit Hilfe des mehrfachen *Mann-Whitney*-Test ermittelt; 24h: n=8,12; 72h: n=8,10; 1 Woche: n=9,10; 3 Wochen: n=13,9; **p<0,01.

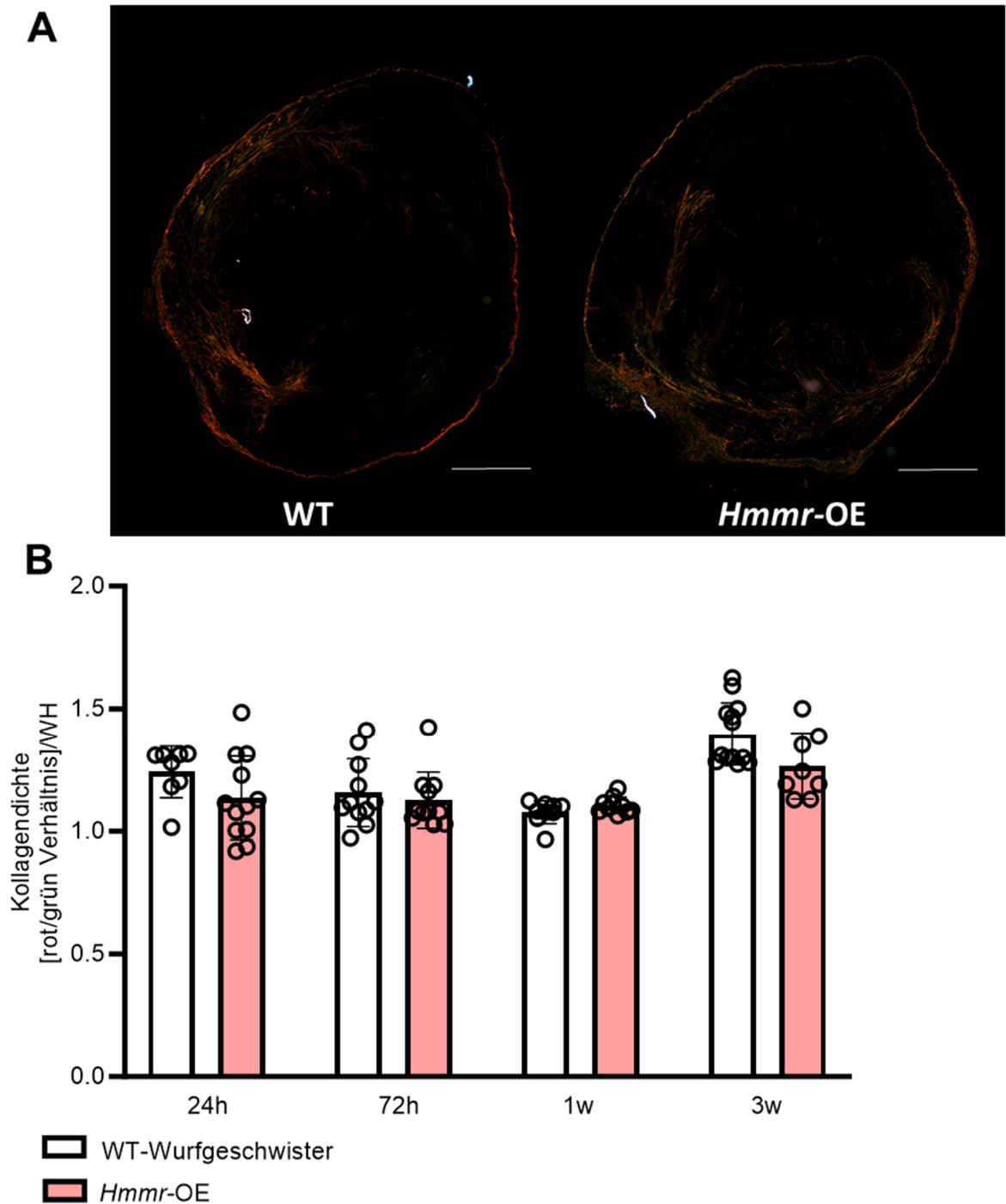


Abbildung 17: Packungsdichte der Kollagenfasern in *Hmmer-OE* Mäusen. Eine Quantifizierung erfolgte mittels Picro-Siriusrot Färbung sowohl 24 Stunden (24h), 72 Stunden (72h), 1 Woche (1w) und 3 Wochen (3w) nach I/R. Die Auswertung der Packungsdichte erfolgte im polarisierten Licht mittels *ImageJ*. Dicht gepackte Kollagenfasern erscheinen rot, locker gepackte Kollagenfasern erscheinen grün, Überlagerungen beider erscheinen orange/gelb und gesundes Gewebe erscheint schwarz. **A**, Repräsentative Bilder 3 Wochen nach I/R, Ebene 5. **B**, Darstellung der Kollagendichte zu den genannten Zeitpunkten. Angefärbt wurden jeweils 10 Ebenen pro Herz, angegeben sind die Werte als rot/grün Verhältnisse des gesamten Herzens (WH). Der Maßstabsbalken entspricht 1000 μ m. Darstellung als Mittelwert \pm SD; Signifikanzen wurden mit Hilfe des mehrfacher *Mann-Whitney*-Test ermittelt; 24h: n=8,12; 72h: n=8,10; 1 Woche: n=9,10; 3 Wochen: n=13,9; **p<0,01.

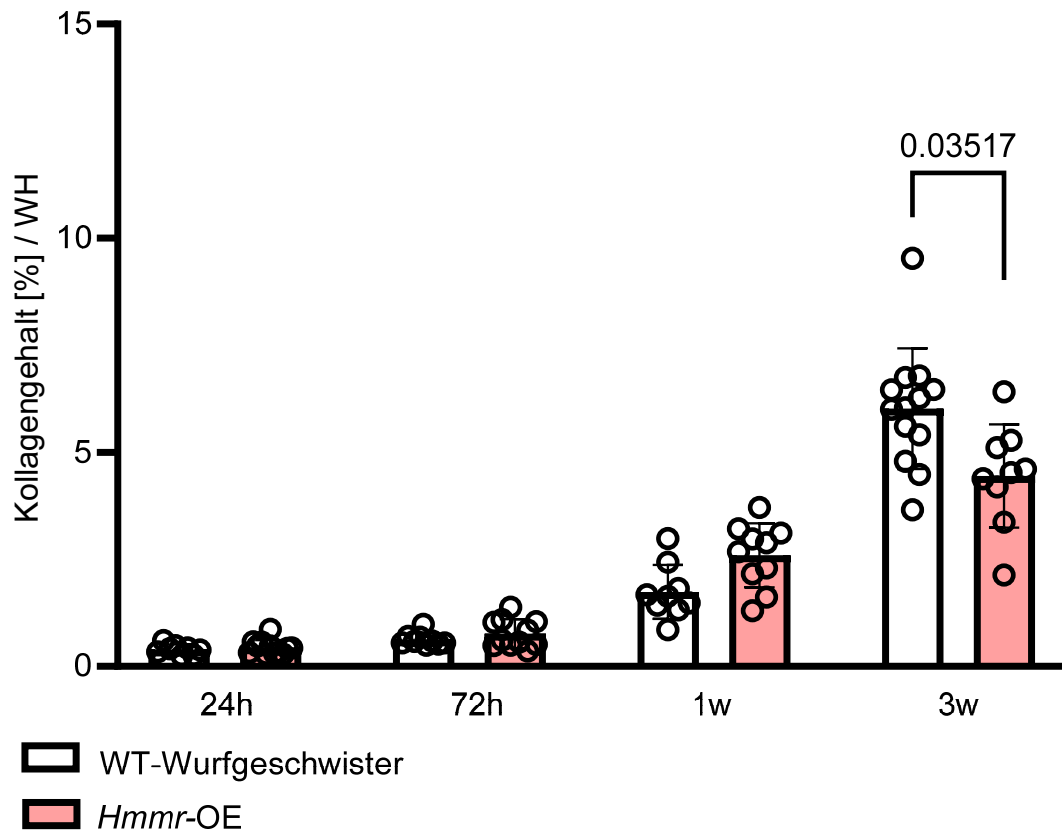


Abbildung 18: Ermittlung des Kollagengehaltes in *Hmnr*-OE Mäusen. Eine Quantifizierung erfolgte mittels Picro-Siriusrot Färbung sowohl 24 Stunden (24h), 72 Stunden (72h), 1 Woche (1w) und 3 Wochen (3w) nach I/R. Die Auswertung des Kollagengehaltes erfolgte im polarisierten Licht mittels *ImageJ*. Erfasst wurden alle Kollagenfasern des Herzgewebes. Darstellung des Kollagengehaltes zu den genannten Zeitpunkten. Angefärbt wurden jeweils 10 Ebenen pro Herz, angegeben sind die Werte als Flächenprozent des gesamten Herzens (WH). Darstellung als Mittelwert \pm SD; Signifikanzen wurden mit Hilfe des mehrfachen *Mann-Whitney*-Test ermittelt; 24h: n=8,12; 72h: n=8,10; 1 Woche: n=9,10; 3 Wochen: n=13,9; **p<0,01.

Für die *Hmnr*-KO Mäuse wurden, wie oben bereits erwähnt, 2 Zeitpunkte nach I/R untersucht. Hier sieht man sowohl 1 Woche, als auch 3 Wochen nach Infarkt eine Tendenz hin zu einer größeren Narbe. Obwohl die Ergebnisse in der Gomori-Trichrome Auswertung 3 Wochen nach Infarkt signifikant sind, ist dies mit der Picro-Siriusrot Färbung hier im Zeitverlauf nicht der Fall (Abbildung 19).

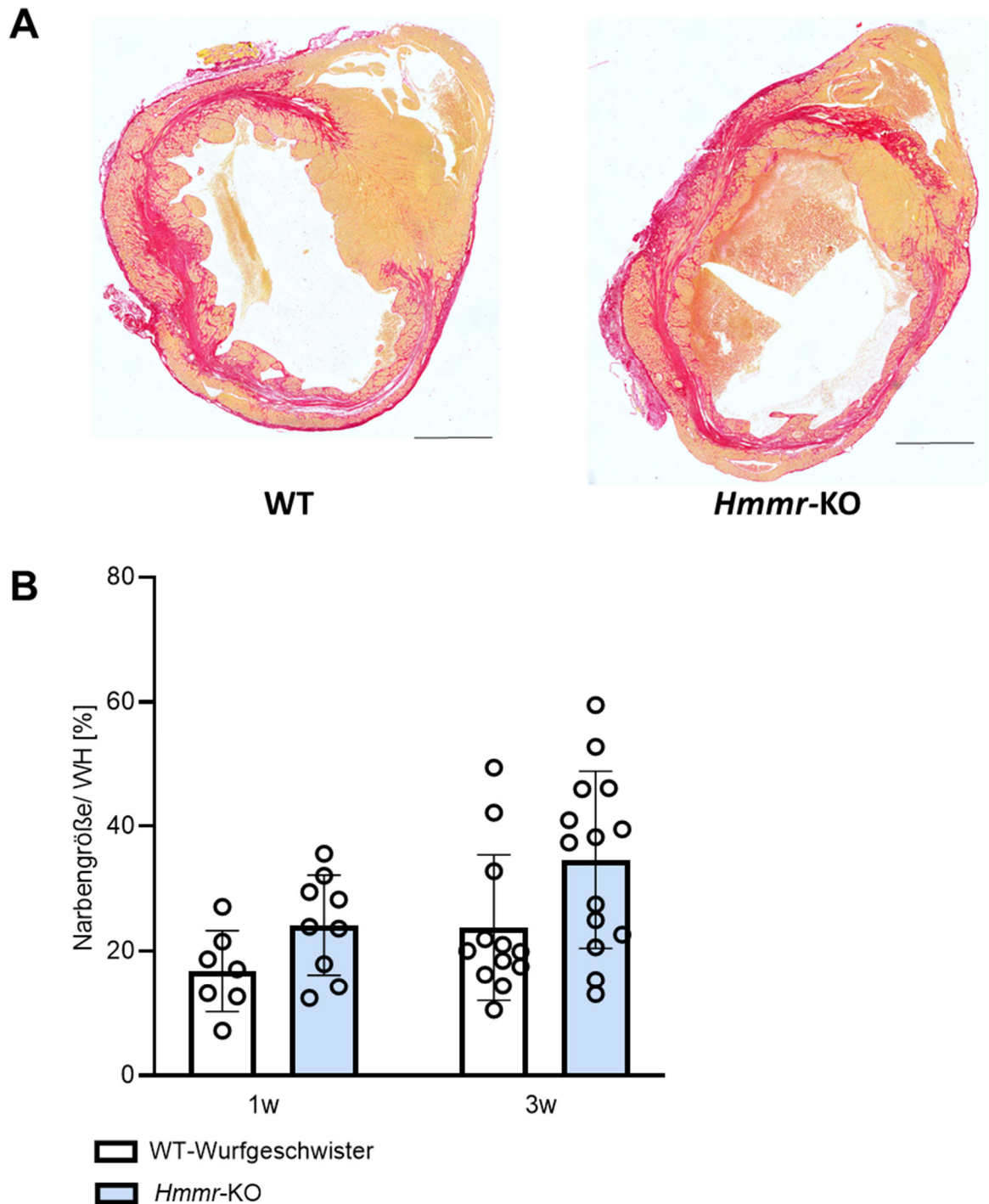


Abbildung 19: Bestimmung der Narbengröße mittels Picro-Siriusrot Färbung der *Hmnr*-KO Mäuse. Sowohl 1 Woche (1w) und 3 Wochen (3w) nach I/R wurden Herzen mittels Picro-Siriusrot Färbung im Hinblick auf den Infarktphänotyp histologisch untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Kollagen erscheint im Durchlicht rot, während gesundes Gewebe gelb erscheint. **A**, Repräsentative Bilder 3 Wochen nach I/R, Ebene 5. **B**, Darstellung der Narbengröße zu den genannten Zeitpunkten. Angefärbt wurden jeweils 10 Ebenen pro Herz, angegeben sind die Werte als Flächenprozent des gesamten Herzens (WH). Der Maßstabsbalken entspricht 1000 μ m. Darstellung als Mittelwert \pm SD; Signifikanzen wurden mit Hilfe des mehrfachen *Mann-Whitney*-Test ermittelt; 1 Woche: $n=7,9$; 3 Wochen: $n=12,14$; $**p<0,01$.

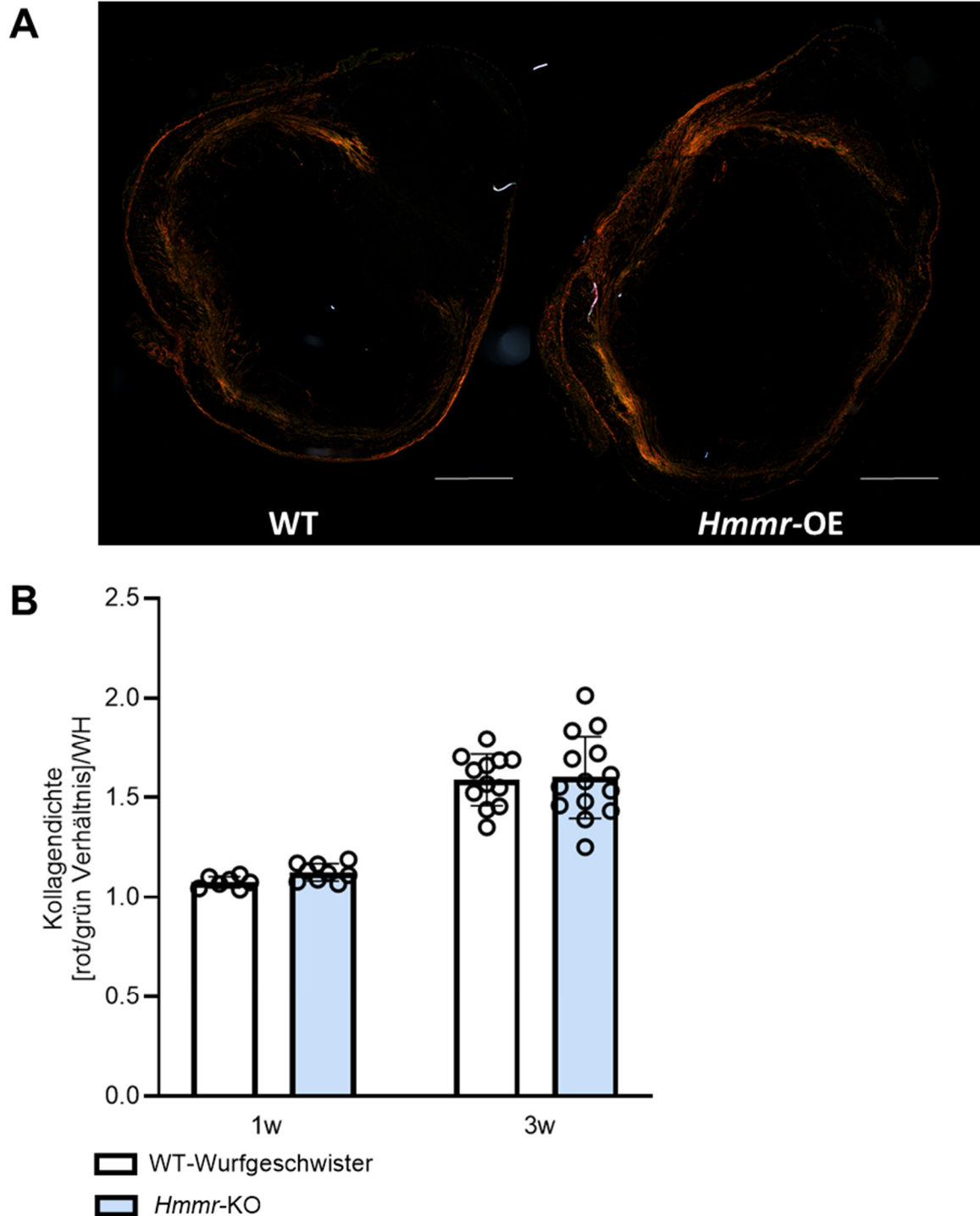


Abbildung 20: Packungsdichte der Kollagenfasern in *Hmmer-KO* Mäusen. Eine Quantifizierung erfolgte sowohl 1 Woche (1w) und 3 Wochen (3w) nach I/R. Die Auswertung der Packungsdichte erfolgte mittels Picro-Siriusrot Färbung im polarisierten Licht mittels *ImageJ*. Dicht gepackte Kollagenfasern erscheinen rot, locker gepackte Kollagenfasern erscheinen grün, Überlagerungen beider erscheinen orange/gelb und gesundes Gewebe erscheint schwarz. **A**, Repräsentative Bilder 3 Wochen nach I/R, Ebene 5. **B**, Darstellung der Kollagendichte zu den genannten Zeitpunkten. Angefärbt wurden jeweils 10 Ebenen pro Herz, angegeben sind die Werte als rot/grün Verhältnisse des gesamten Herzens (WH). Der Maßstabsbalken entspricht 1000 μm . Darstellung als Mittelwert \pm SD; Signifikanzen wurden mit Hilfe des mehrfachen *Mann-Whitney*-Test ermittelt; 1 Woche: $n=7,9$; 3 Wochen: $n=12,14$; ** $p<0,01$.

Auch hier wurde die Packungsdichte der Kollagenfasern untersucht und zeigt sowohl 1 Woche als auch 3 Wochen nach I/R keine Unterschiede (Abbildung 20). Betrachtet man den Kollagengehalt insgesamt, dann sieht man zu beiden Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung desselben (Abbildung 21).

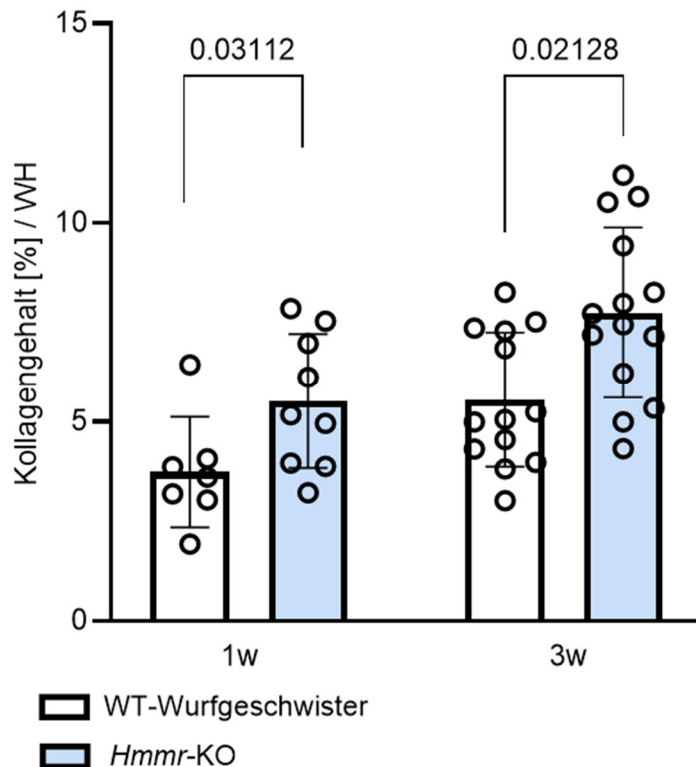


Abbildung 21: Ermittlung des Kollagengehaltes in *Hmnr*-KO Mäusen. Eine Quantifizierung erfolgte mittels Picro-Siriusrot Färbung sowohl 24 Stunden (24h), 72 Stunden (72h), 1 Woche (1w) und 3 Wochen (3w) nach I/R. Die Auswertung des Kollagengehaltes erfolgte im polarisierten Licht mittels *ImageJ*. Erfasst wurden alle Kollagenfasern des Herzgewebes. Darstellung des Kollagengehaltes zu den genannten Zeitpunkten. Angefärbt wurden jeweils 10 Ebenen pro Herz, angegeben sind die Werte als Flächenprozent des gesamten Herzens (WH). Darstellung als Mittelwert ± SD; Signifikanzen wurden mit Hilfe des mehrfachen *Mann-Whitney*-Test ermittelt; 1 Woche: n=7,9; 3 Wochen: n=12,14; **p<0,01.

3.6 Stiffness

Nach Auswertung der Gomori-Trichrom Färbung und der Picro-Siriusrot Färbung inklusive der Kollagenmenge und Packungsdichte der Kollagenfasern (siehe 3.5) wurde die Messung der passiven Steifigkeit der Kardiomyozyten an isolierten Myozyten, wie unter 2.4 beschrieben, durchgeführt. Dies erfolgte für *Hmnr*-OE Herzen sowohl 72 Stunden, als auch 3 Wochen nach I/R.

Obwohl in der echokardiografischen Auswertung keine Unterschiede ermittelt werden konnten, wäre es möglich gewesen, dass Unterschiede in der kollagenhaltigen Matrix zu Unterschieden in der Kraftmessung der Herzmuskelzellen führen. Speziell auf diese Methode bezogen wurde jedoch die Matrix inklusive des Kollagens durch die Tritonbehandlung der Zellen entfernt. Bei

der *Stiffness* Messung hier wird ausschließlich die durch Titin vermittelte passive Steifigkeit gemessen. Nichtsdestotrotz konnten für beide gemessenen Zeitpunkte keine signifikanten Unterschiede detektiert werden (Abbildung 22).

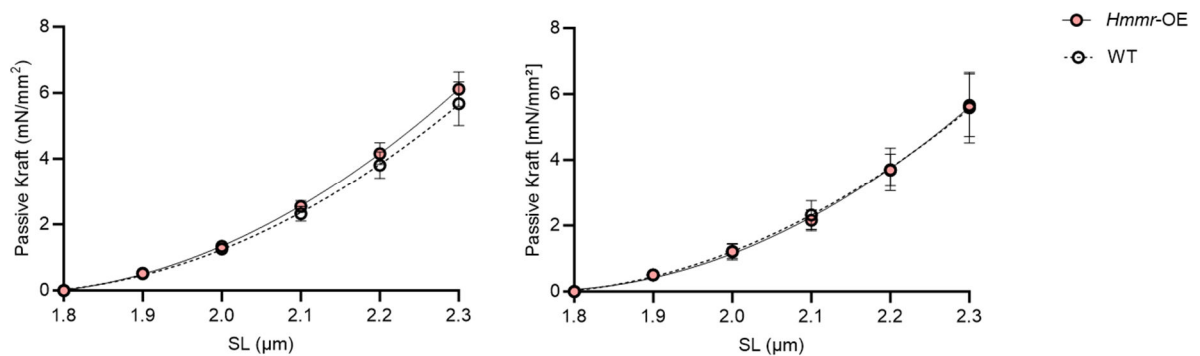


Abbildung 22: Durchführung der passiven Kraftmessung nach I/R. A, Passive Kraftmessung 72 Stunden nach I/R, n=5,5. **B,** Passive Kraftmessung 3 Wochen nach I/R, n=6,7. Die Erhebung dieser Daten erfolgte durch Dr. Sebastian Kötter.

3.7 Immunfärbungen

Nun stellte sich die Frage, in welcher Weise RHAMM einen Einfluss auf den Unterschied, sowohl in der Narbengröße, als auch im Kollagengehalt und der Herzfunktion hat. Zur Erlangung erster Ansatzpunkte wurde mit *Hmmer*-OE Mäusen 72 Stunden und 1 Woche nach I/R einer *single cell* Analyse unterzogen, deren Beschreibung unter 1.2.3 zu finden ist. Hier ergaben sich Hinweise auf Gene, welche nach kardialer I/R signifikant hoch- bzw. herunterreguliert waren (Abbildung 3). Die histologische Überprüfung der daraus resultierenden Proteine schien ein interessantes Target für immunhistochemische Färbungen dazustellen. Ausgesucht wurden dabei Kollagen des Typs VA1 und VIA1 sowie CCN2, CCN5, Decorin, Dermatotontin und COMP. Die Färbemethoden sind dabei unter 2.6.3 beschrieben. Im Folgenden wird im Detail auf die Ergebnisse eingegangen.

3.7.1 Der Einfluss von RHAMM auf weitere Kollagene

Im Rahmen der Picro-Siriusrot Färbung, konnten Unterschiede zu diversen Zeitpunkten nach I/R und auch zwischen den Genotypen dargestellt werden (Abbildungen 16-21). Auch in der *single cell* Analyse kristallisierten sich für die *Hmmer*-OE Mäuse zahlreiche Gene heraus, welche für die Bildung und Organisation der Kollagenfibrillen heraufreguliert waren. Hingegen waren Gene, die für die Kollagene selbst kodieren herabreguliert.

Vor allem Kollagen vom Typ VA1 und Kollagen vom Typ VIA1 stellten sich dabei als am vielversprechendsten heraus.

3.7.1.1 Kollagen V

In der *single cell* Analyse zeigte sich entlang der *Pseudotime* – einem IT-basiertem Zeitverlauf - weniger Kollagen VA1 in den *Hmmr*-OE Mäusen.

Kollagen vom Typ V kommt vergleichsweise selten vor. Es ist Bestandteil der EZM und besteht aus drei α -Ketten, die zu einem triplehelikalen Molekül zusammengefügt sind¹⁸². Es ist besonders wichtig für die Struktur und Festigkeit von Geweben, wie der Haut, Gelenkknorpel und Sehnen¹⁸³. Obwohl es sich hierbei ja um ein Kollagen handelt, ist dieses wiederum für die Bildung anderer Kollagene mitverantwortlich¹⁸³. Eine Interaktion findet vor allem mit Kollagen I statt¹⁸².

Im menschlichen Organismus führen Mutationen im Kollagen-Typ-V-Gen beispielsweise zu dem Ehlers-Danlos-Syndrom. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine genetisch recht heterogene Bindegewebsstörung. Je nach Mutation kommt es zu unterschiedlichen Symptomen. Bei einem Defekt im *Col5A1* Gen, weisen diese Patienten unter anderem Symptome wie eine Haut- und Gelenkhypermobilität, atrophische Narben und leichte Blutergüsse auf¹⁸⁴.

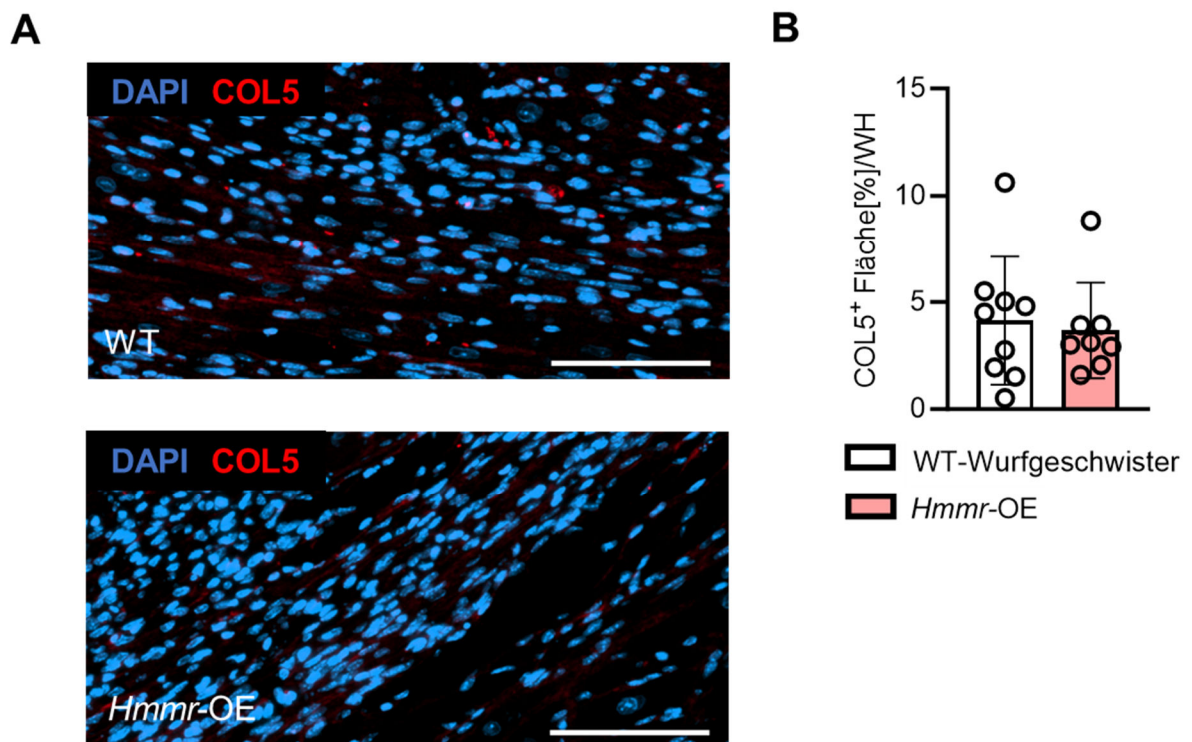


Abbildung 23: Immunhistochemische Bestimmung des Kollagen 5A1 - Gehaltes in *Hmmr*-OE Mäusen 1 Woche nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen Kollagen vom Subtyp VA1 immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der Kollagen 5 gefärbten Schnitte in *Hmmr*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtypen (WT). **B**, Quantifizierung der Kollagen VA1 positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9,8.

Für die *Hmmr*-OE Mäuse wurde Kollagen vom Typ V 1 Woche (Abbildung 23) und 3 Wochen (Abbildung 24) nach Infarkt angefärbt. Zu beiden Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

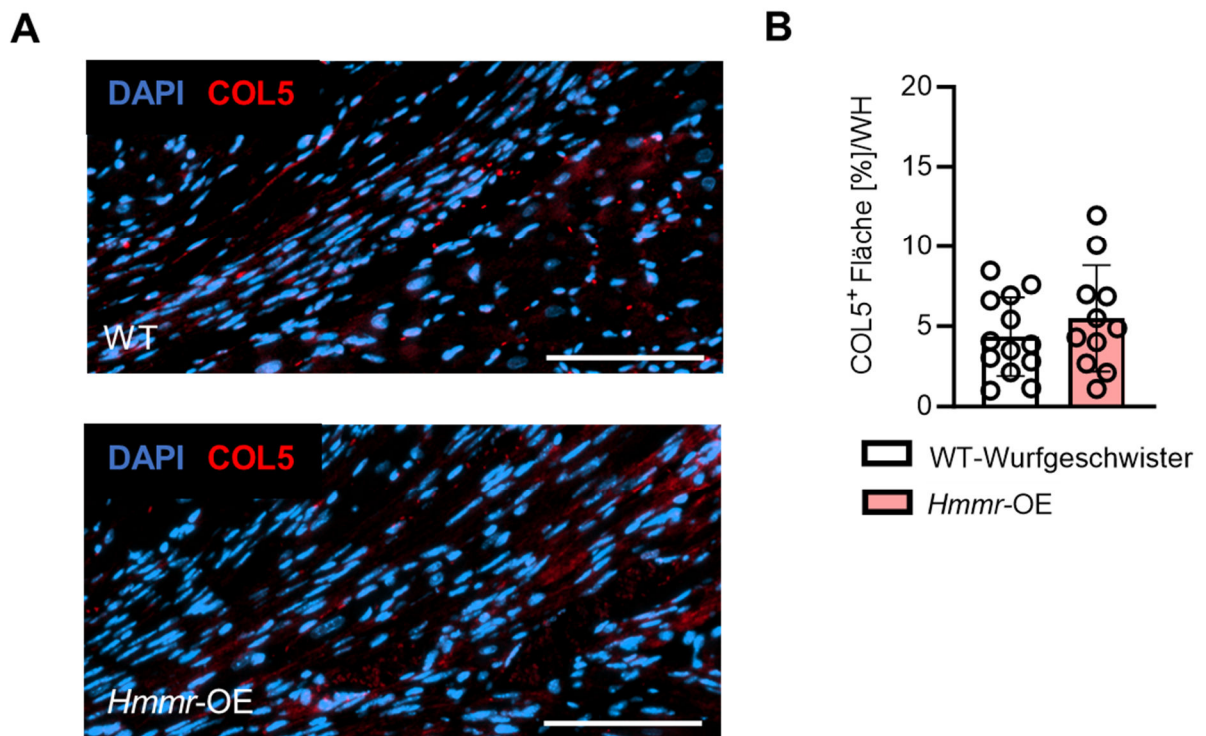


Abbildung 24: Immunhistochemische Bestimmung des Kollagen 5A1 - Gehaltes in *Hmmr*-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen Kollagen vom Subtyp VA1 immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der Kollagen 5 gefärbten Schnitte in *Hmmr*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtyp (WT). **B**, Quantifizierung der Kollagen VA1 positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=13,11.

3.7.1.2 Kollagen VI

Auch Kollagen vom Typ VI kristallisierte sich wie bereits erwähnt als interessante Zielstruktur heraus. In der *single cell* Analyse zeigte sich entlang der *Pseudotime* weniger Kollagen VI in den *Hmmr*-OE Mäusen.

Auch Kollagen vom Typ VI ist Bestandteil der EZM und hält eine wichtige Rolle der Struktur und Funktion dieser inne¹⁸⁵. Es besteht aus 3 α -Ketten, die zu einem triplehelikalen Molekül zusammengefügt sind¹⁸⁵. Auch dieses Kollagen kommt vor allem in Sehnen, Gelenken und der Skelettmuskulatur vor¹⁸⁵. Es unterstützt durch seine Struktur andere Kollagen in deren Organisation, vor allem Typ I, II, IV und XIV¹⁸⁵. Die daraus entstehenden Netzwerke tragen zur Festigkeit und Elastizität des Gewebes bei und spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Zellen und der Inhibition der Apoptose¹⁸⁵. Im menschlichen Organismus führt eine Mutation des Kollagen-Typ-VI-Gens beispielsweise zu dem Bethlem-Myopathie-

Syndrom oder dem Ullrich-Kongenitalen-Muskeldystrophie-Syndrom. Letztere Erkrankung zeichnet sich durch Muskelschwäche und Gelenksteifigkeit aus¹⁸⁶.

Für die *Hmmr*-OE Mäuse wurde Kollagen vom Typ VIA1 1 Woche und 3 Wochen nach Infarkt untersucht. Zu beiden Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede identifiziert werden (Abbildung 25 und 26).

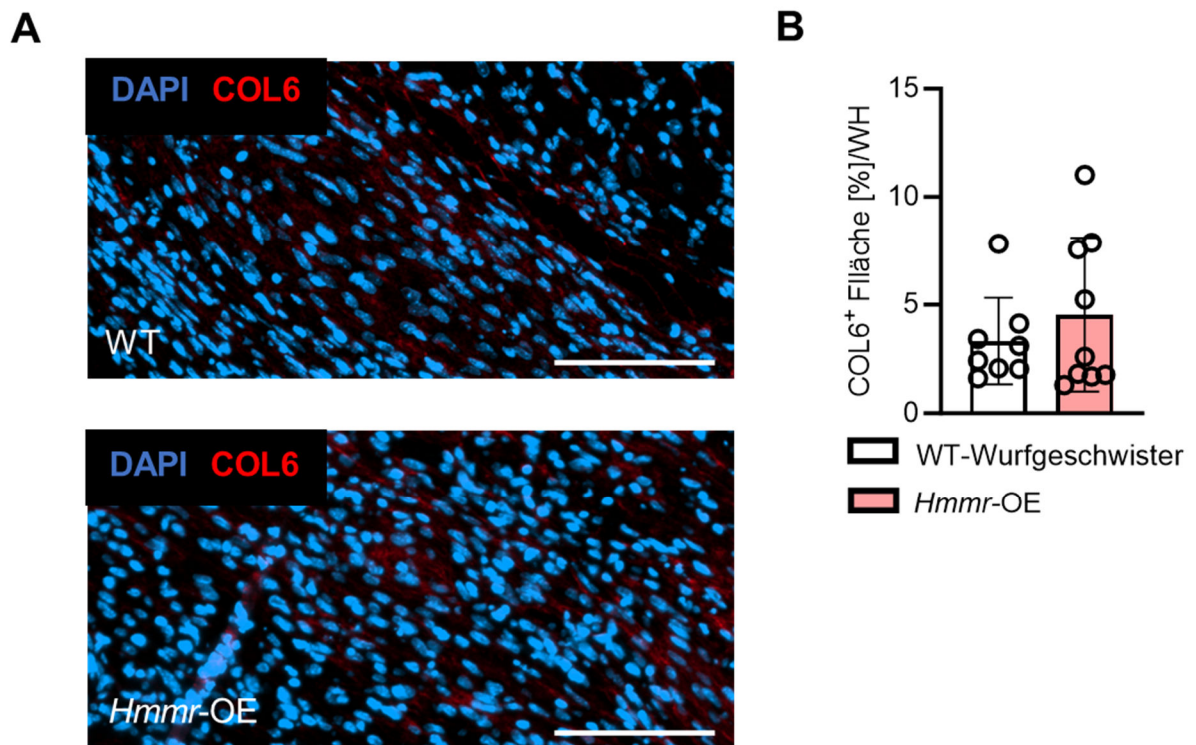


Abbildung 25: Immunhistochemische Bestimmung des Kollagen 6A1 – Gehaltes in *Hmmr*-OE Mäusen 1 Woche nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen Kollagen vom Subtyp VIA1 immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der Kollagen 6 gefärbten Schnitte in *Hmmr*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtypen (WT). **B**, Quantifizierung der Kollagen VIA1 positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD; n=8,9.

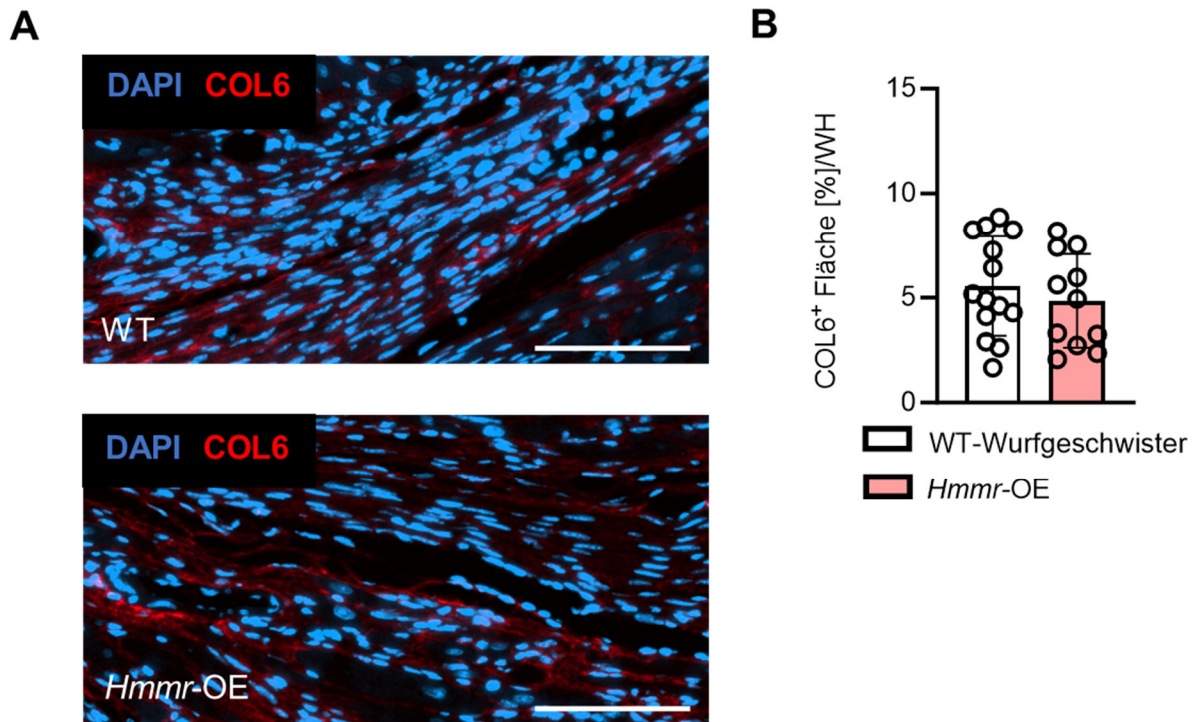


Abbildung 26: Immunhistochemische Bestimmung des Kollagen 6A1 - Gehaltes in *Hmmer-OE* Mäusen 3 Wochen nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen Kollagen vom Subtyp VIA1 immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der Kollagen 6 gefärbten Schnitte in *Hmmer-OE* Mäusen und den dazugehörigen Wildtypen (WT). **B**, Quantifizierung der Kollagen VIA1 positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=14,11.

3.7.2 Der Einfluss von RHAMM auf die postischämische Entzündung

Auch wäre ein Einfluss von RHAMM auf die Entzündungsreaktion nach I/R denkbar. So wurde die Immunantwort der Makrophagen 1 Woche nach Infarkt untersucht, da sich aus einer vorherigen Arbeit unserer Arbeitsgruppe Hinweise auf eine Regulierung dieses Parameters ergaben.

3.7.2.1 Immunantwort der Makrophagen 1 Woche nach Infarkt

Zur Quantifizierung der Immunantwort der Makrophagen stellt die Anfärbung des Glykoproteins CD68 ein geeignetes Verfahren dar. Es handelt sich dabei um einen Oberflächenmarker, welcher in Immunhistochemischen Färbungen häufig zur Detektion von Makrophagen genutzt wird¹⁸⁷. Man findet diesen allerdings auch auf der Oberfläche von Monozyten und anderen Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) wieder¹⁸⁸.

Durchgeführt wurde die Färbung für *Hmmer-OE* Mäuse 1 Woche nach kardialer I/R. Zwischen den Genotypen konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden, wobei jedoch eine leichte Tendenz zu mehr CD68 in den *Hmmer-OE* Mäusen sichtbar ist (Abbildung 27).

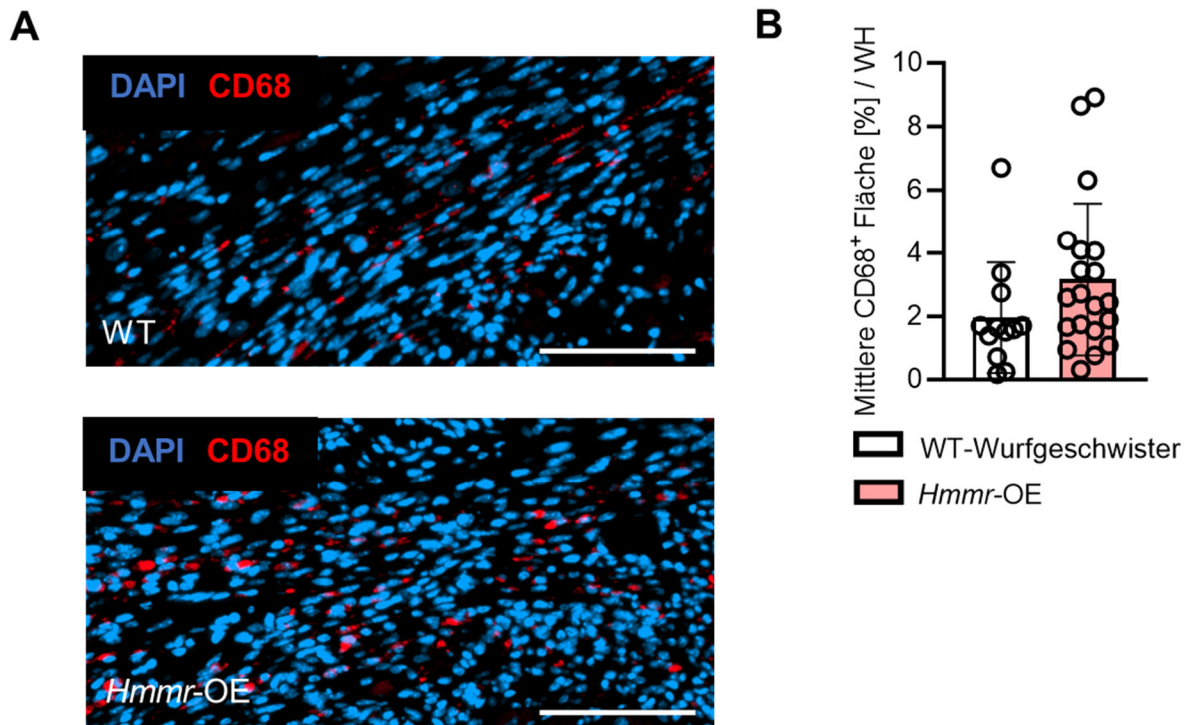


Abbildung 27: Immunhistochemische Bestimmung von Makrophagen im Herzgewebe in *Hmmer*-OE Mäusen 1 Woche nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen CD68 immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der CD68-gefärbten Schnitte in *Hmmer*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtypen (WT). **B**, Quantifizierung der CD68-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=12,16.

3.7.3 Der Einfluss von RHAMM auf die postischämische EZM-Organisation

Wie bereits unter 1.2.3 beschrieben ergaben sich in der *single cell* Analyse Hinweise auf Gene, die für Proteine kodieren, welche für die Organisation der Kollagenfibrillen verantwortlich sind. Diese waren in dieser Analyse nach I/R heraufreguliert. Im Folgenden werden die Ergebnisse beschrieben.

3.7.3.1 Decorin Färbung

Auch dieses Molekül kristallisierte sich als interessante Zielstruktur heraus. In der *single cell* Analyse zeigte sich entlang der *Pseudotime* weniger Decorin in den *Hmmer*-OE Mäusen. Bei Decorin handelt es sich um ein relativ kleines Proteoglykan, welches vor allem im Bindegewebe und der EZM der Gelenkknorpel vorkommt¹⁸⁹. Chemisch betrachtet handelt es sich um ein Protein, an das mehrere Glykosaminoglykan-Ketten (GAG-Ketten) gebunden sind¹⁸⁹. Nennenswert sind hier vor allem Dermatan- und Chondroitinsulfat. Die GAG-Ketten unterscheiden sich je nach Lokalisation in ihrem Aufbau, sind also recht heterogen¹⁸⁹. Im Organismus erfüllt Decorin verschiedene Funktionen und stellt eines der vielseitigsten Proteoglykane dar. Es ist an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt, wie etwa an der Angiogenese^{190,191}, es spielt eine Rolle bei Entzündungsprozessen^{192,193} und der

Wundheilung¹⁹⁴. Dadurch wird deutlich, dass Decorin im Bereich der Wundheilung, Fibrose und der Onkologie von Bedeutung sein kann. Eine Interaktion von Decorin findet vor allem mit Kollagenen des Typs I und II statt, aber auch mit Thrombospondin und Fibronektin. Die Interaktion mit den Kollagenen findet dabei mit dem Kernprotein statt und verlangsamt die Kollagenfibrillogenese¹⁹⁵. Außerdem hat Decorin eine hohe Affinität zu TGF- β 1 und bindet dieses an das Kernprotein. Dadurch erhöht sich dessen Aktivität bzw. Affinität zum Rezeptor¹⁹⁵. Für die *Hmmr*-OE Mäuse wurde Decorin zu zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Einmal 1 Woche und 3 Wochen nach Infarkt. Zu beiden Zeitpunkten waren keine signifikanten Unterschiede detektierbar (Abbildung 28 und 29).

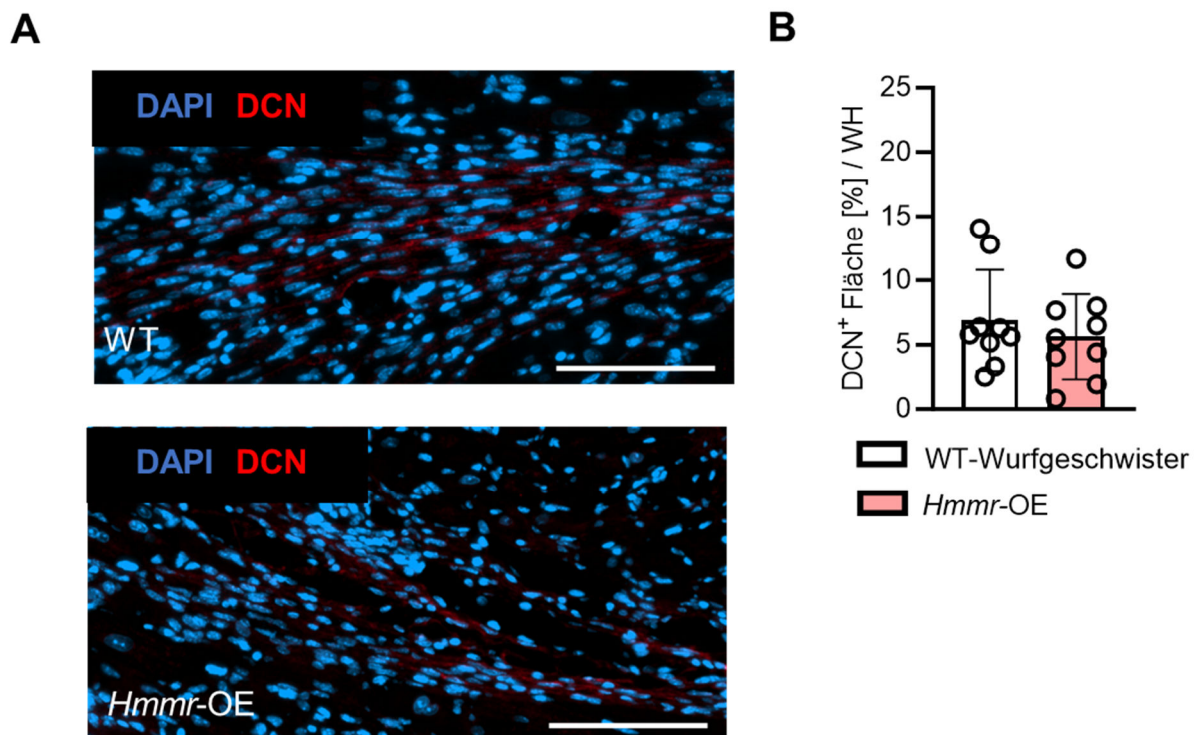


Abbildung 28: Immunhistochemische Bestimmung des Decorin – Gehaltes in *Hmmr*-OE Mäusen 1 Woche nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen Decorin immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der Decorin gefärbten Schnitte in *Hmmr*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtypen (WT). **B**, Quantifizierung der Decorin-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9,9.

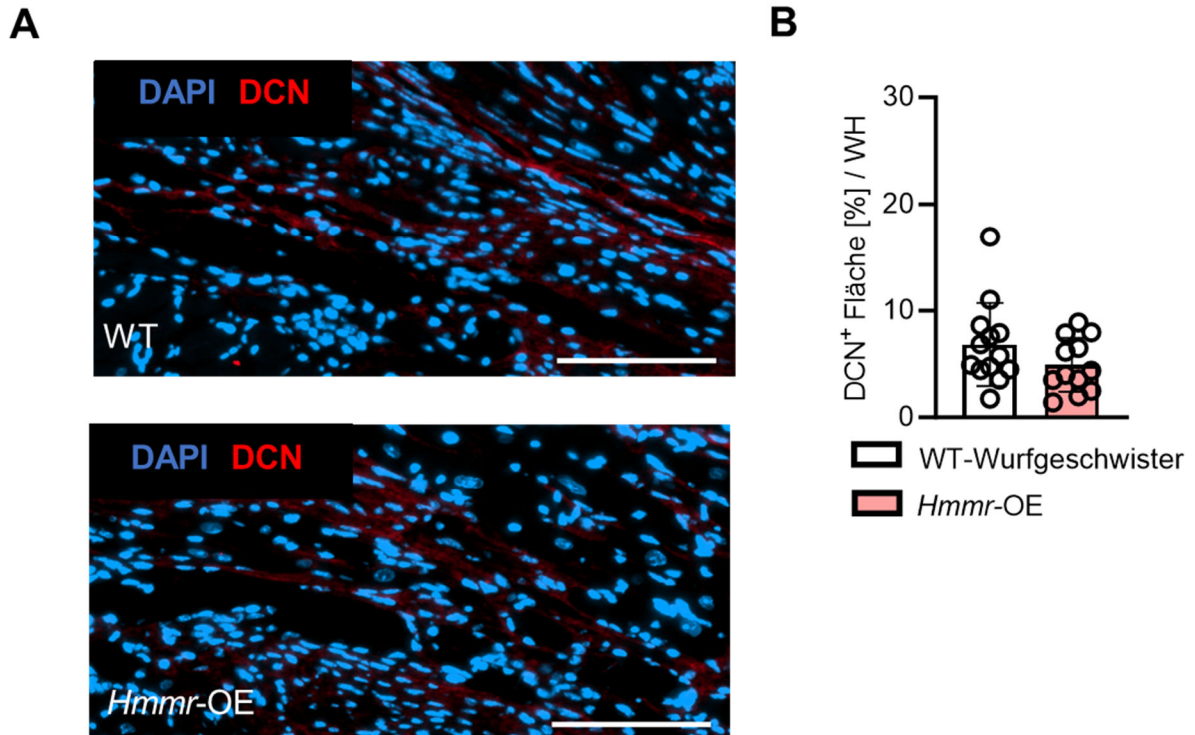


Abbildung 29: Immunhistochemische Bestimmung des Decorin - Gehaltes in *Hmmer*-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen Decorin immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der Decorin-gefärbten Schnitte in *Hmmer*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtypen (WT). **B**, Quantifizierung der Decorin-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=13,12.

3.7.3.2 Dermato pontin

Auch bei Dermato pontin, welches auch unter dem Namen TRAMP bekannt ist, handelt es sich um einen Bestandteil der EZM¹⁹⁶. Dieses Molekül ist unter anderem auch für die Organisation und damit Struktur und Festigkeit von Kollagenfibrillen verantwortlich¹⁹⁶. Bereits 1993 konnte gezeigt werden, dass Dermato pontin die Kollagen Bildung von Kollagenfibrillen *in vitro* beschleunigt¹⁹⁶. Weiterhin spielt es eine Rolle in der Zellmigration und –Adhäsion, was von Liu *et al.* 2013 an Herzfibroblasten *in vitro* nachgewiesen werden konnte¹⁹⁷.

Für die *Hmmer*-OE Mäuse wurde Dermato pontin 1 Woche und 3 Wochen nach I/R angefärbt. 1 Woche nach Infarkt konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden (Abbildung 30), jedoch ist 3 Wochen nach Infarkt zeigen die *Hmmer*-OE Mäuse signifikant weniger Dermato pontin (Abbildung 31).

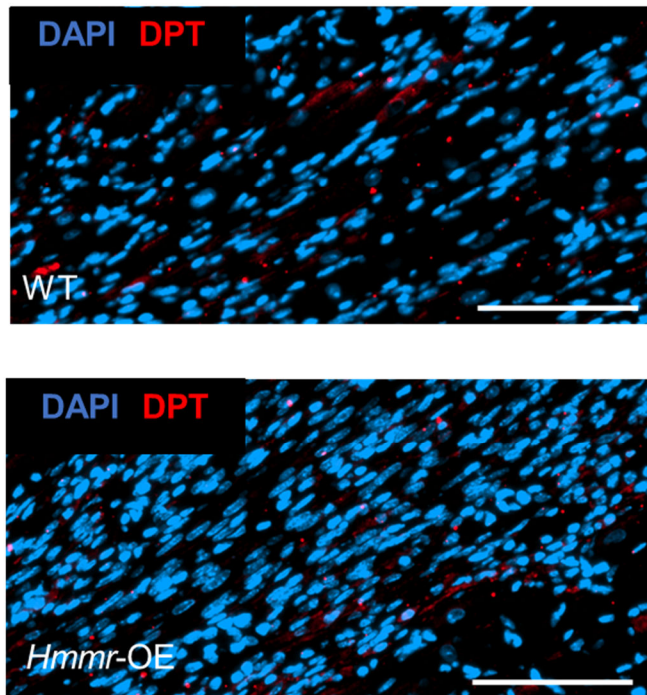
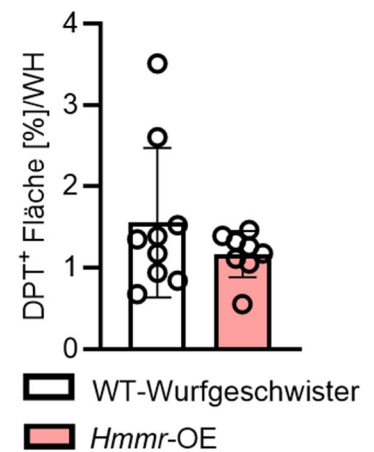
A**B**

Abbildung 30: Immunhistochemische Bestimmung des Dermatopontin – Gehaltes in *Hmnr*-OE Mäusen 1 Woche nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen Dermatopontin immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der Dermatopontin-gefärbten Schnitte in *Hmnr*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtyptieren (WT). **B**, Quantifizierung der Dermatopontin-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9,8.

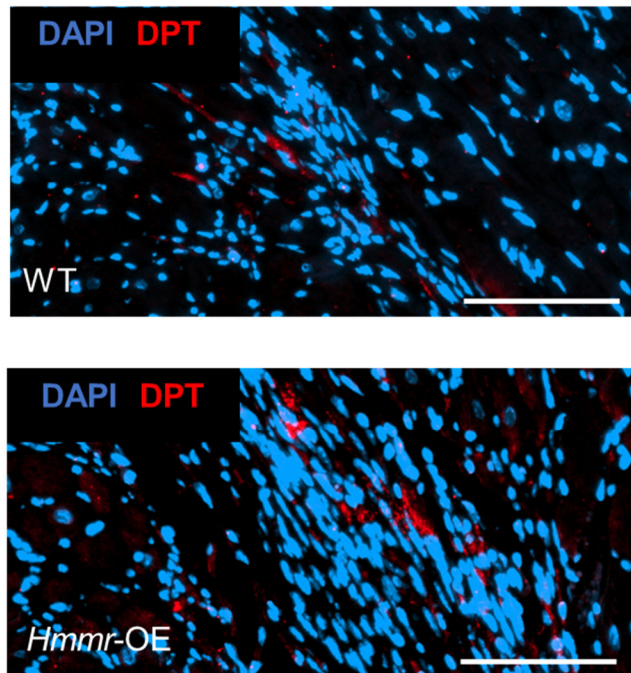
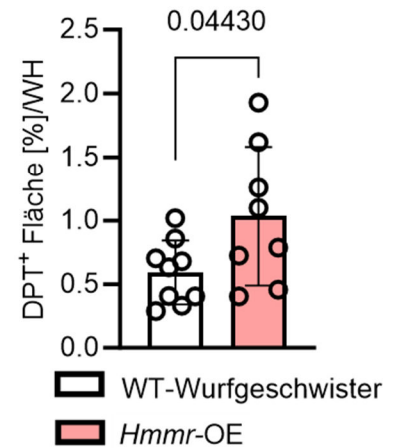
A**B**

Abbildung 31: Immunhistochemische Bestimmung des Dermatopontin – Gehaltes in *Hmnr*-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen Dermatopontin immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der Dermatopontin-gefärbten Schnitte in *Hmnr*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtyptieren (WT). **B**, Quantifizierung der Dermatopontin-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD; n=9,8; *p<0,05.

3.7.3.3 CCN2

Bei CCN2 handelt es sich um den sogenannten "*Connective Tissue Growth Factor*" (CTGF), wörtlich übersetzt also um einen "Bindegewebs-Wachstumsfaktor"¹⁹⁸. Auch hier handelt es sich um eine Struktur der EZM, welche unter anderem für die Zellproliferation und -differenzierung sowie Adhäsion verantwortlich ist¹⁹⁹.

Im Organismus werden dabei diverse Funktionen von CCN2 innegehalten, unter anderem die Kollagenfibrillogenese und die Bildung anderer Matrixproteine¹⁹⁹. Durch diese Funktionen ist es naheliegend, dass eine erhöhte CCN2-Expression u.a. zu Fibrose führen kann. Entlang der *Pseudotime* wiesen die *Hmnr*-OE Mäusen mehr CCN2 verglichen zu deren wildtypischen Geschwistertieren auf.

Für die *Hmnr*-OE Mäuse wurde CCN2 1 Woche und 3 Wochen nach Infarkt untersucht. Zu beiden Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Abbildung 32 und 33).

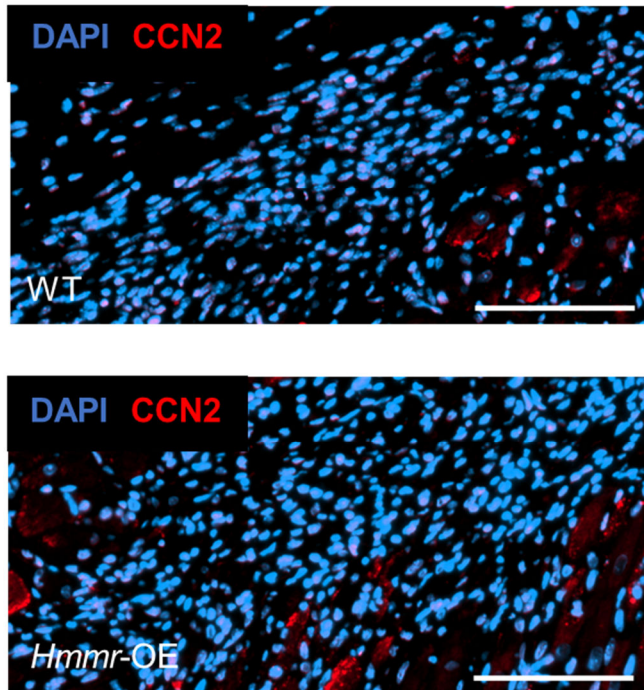
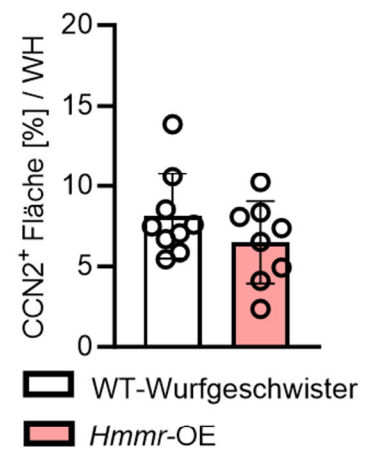
A**B**

Abbildung 32: Immunhistochemische Bestimmung des CCN2 - Gehaltes in *Hmmer*-OE Mäusen 1 Woche nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen CCN2 immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der CCN2-gefärbten Schnitte in *Hmmer*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtypen (WT). **B**, Quantifizierung der CCN2-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9,8.

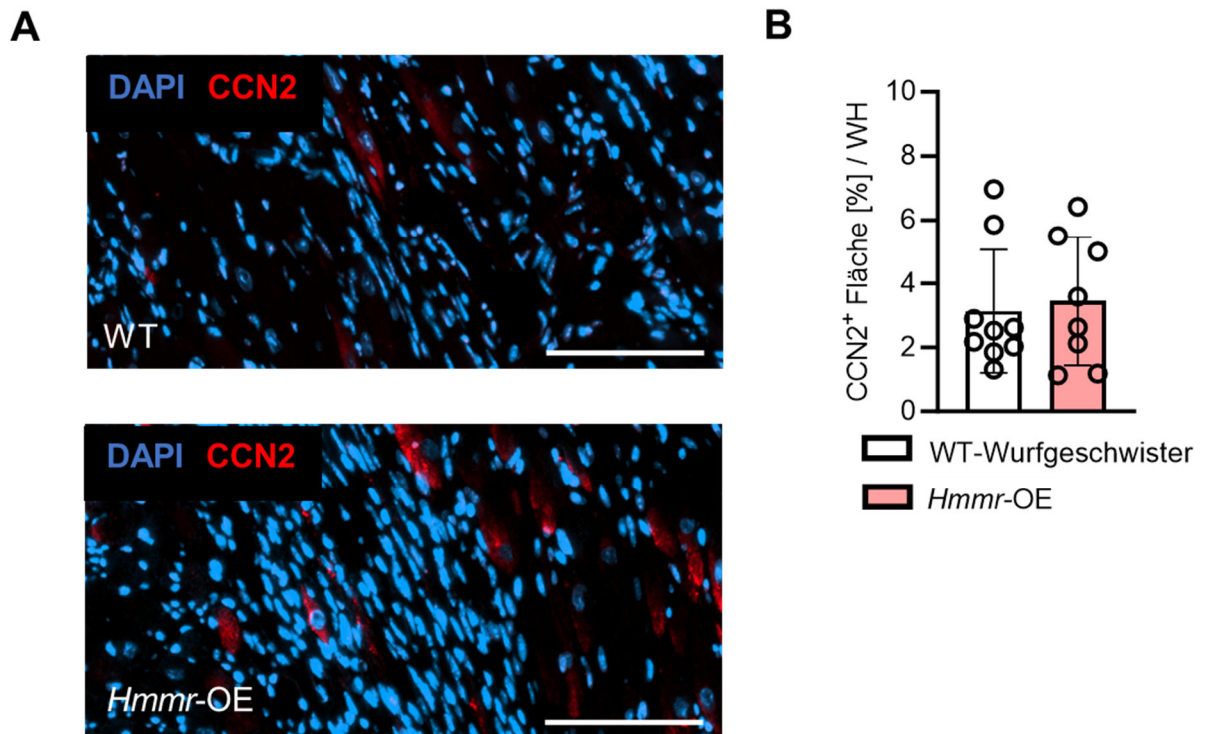


Abbildung 33: Immunhistochemische Bestimmung des CCN2 - Gehaltes in *Hmmer*-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen CCN2 immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der CCN2-gefärbten Schnitte in *Hmmer*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtypen (WT). **B**, Quantifizierung der CCN2-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9,8.

3.7.3.4 CCN5

Bei CCN5 handelt es sich um ein weiteres Protein der CCN-Familie, welches auch als WISP-2 (WNT1-induzierendes Signalprotein-2) bekannt ist²⁰⁰. Auch dieses ist eine Struktur der EZM, jedoch erfüllt es im Organismus andere Funktionen als beispielsweise CCN2¹⁹⁹. Es konnte gezeigt werden, dass CCN5 die Proliferation hemmt und dessen Expression in Tumoren reduziert ist²⁰¹⁻²⁰³. Eine Expression von CCN5 findet in verschiedenen Geweben statt, unter anderem auch im Herzen, der Bauchspeicheldrüse und der Lunge, aber auch in Gefäßen und in der Milz. Interessanterweise hält CCN5 auch eine Funktion in Myofibroblasten²⁰⁴ inne. Hier induziert es die Apoptose durch eine SMAD7-vermittelte Hemmung von NF κ B²⁰⁴.

Entlang der *Pseudotime* wiesen die *Hmmer*-OE Mäuse mehr CCN5 verglichen zu deren wildtypischen Geschwistertieren auf.

Für die *Hmmer*-OE Mäuse wurde CCN5 1 Woche und 3 Wochen nach Infarkt angefärbt. Zu beiden Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Abbildung 34 und 35).

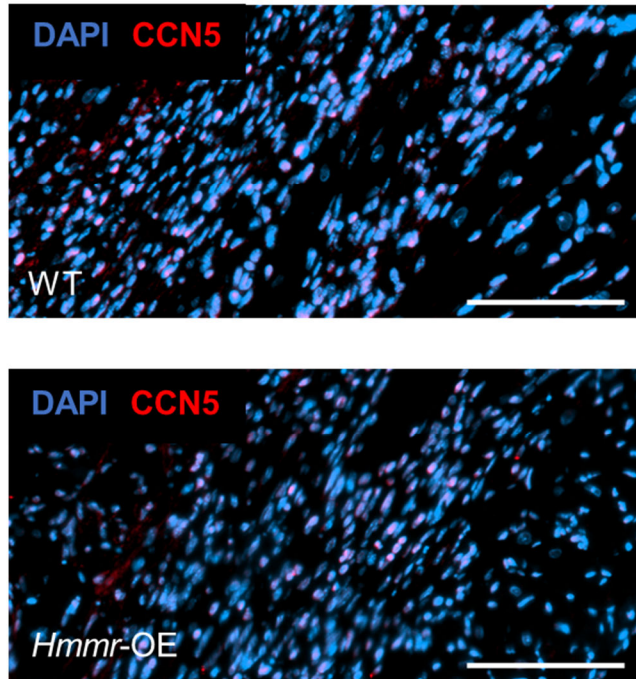
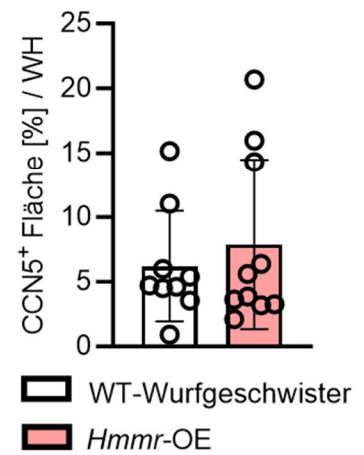
A**B**

Abbildung 34: Immunhistochemische Bestimmung des CCN5 - Gehaltes in *Hmnr*-OE Mäusen 1 Woche nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen CCN5 immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der CCN5-gefärbten Schnitte in *Hmnr*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtyptieren (WT). **B**, Quantifizierung der CCN5-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=9,10.

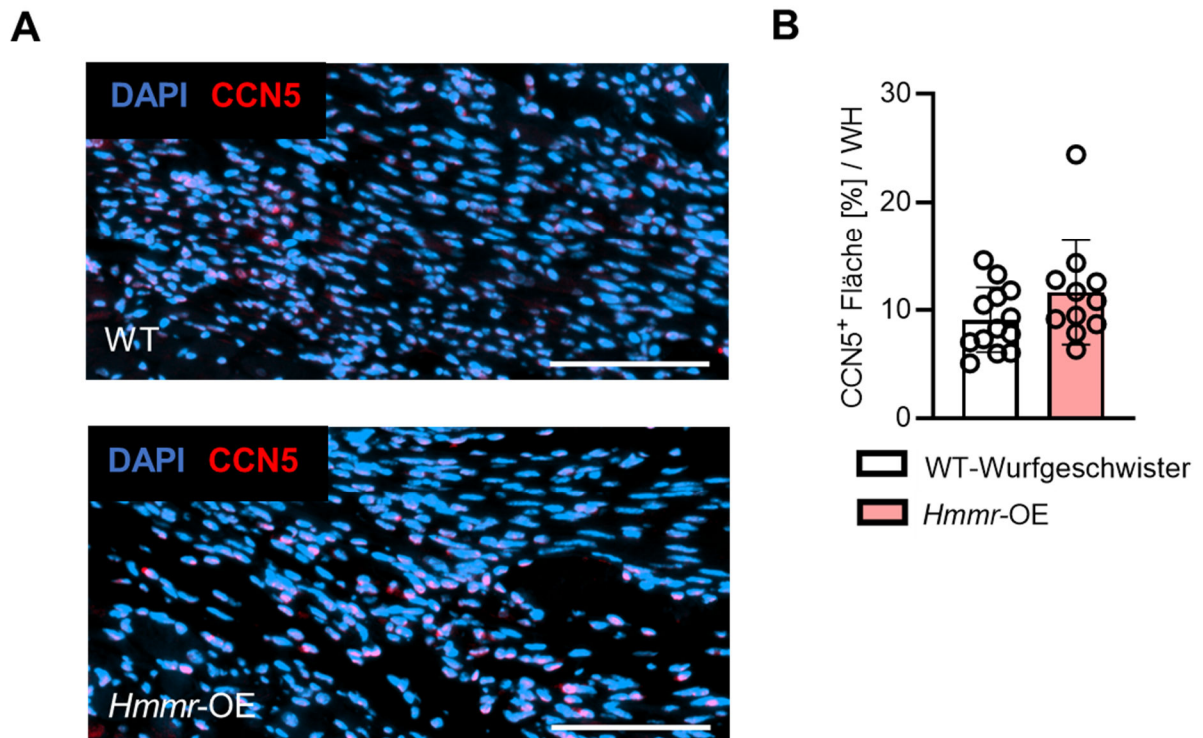


Abbildung 35: Immunhistochemische Bestimmung des CCN5 - Gehaltes in *Hmnr*-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen CCN5 immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der CCN5-gefärbten Schnitte in *Hmnr*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtypischen (WT). **B**, Quantifizierung der CCN5-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=13,11.

3.7.3.5 COMP

Bei dem Protein COMP handelt es sich um das sogenannte „*Cartilage Oligomeric Matrix Protein*“²⁰⁵. Im Organismus kommt es hauptsächlich im Gelenkknorpel vor, aber auch in Sehnen und der Haut²⁰⁵.

Im Knorpelgewebe trägt COMP zur physiologischen Funktionsweise bei und sorgt für dessen Stabilität und Elastizität²⁰⁵. COMP ordnet sich dabei zu Pentameren zusammen, wobei diese Pentamere an Kollagenfibrillen binden²⁰⁵. Außerhalb der Gelenke erfüllt COMP auch Funktionen im Zusammenhang mit der Zelladhäsion und -migration²⁰⁵. Entlang der *Pseudotime* wiesen die *Hmnr*-OE Mäuse mehr COMP verglichen zu deren wildtypischen Geschwistertieren auf.

Für die *Hmnr*-OE Mäuse wurde COMP 1 Woche und 3 Wochen nach Infarkt angefärbt. 1 Woche nach Infarkt zeigten die *Hmnr*-OE Mäuse signifikant mehr COMP (Abbildung 36), wobei dieser Unterschied 3 Wochen nach Infarkt nicht mehr zu sehen war (Abbildung 37). Auch für die *Hmnr*-KO Mäuse wurde diese Färbung zu beiden Zeitpunkten durchgeführt. Leider ergab sich hier zu beiden Zeitpunkten kein Unterschied (Abbildung 38 und 39).

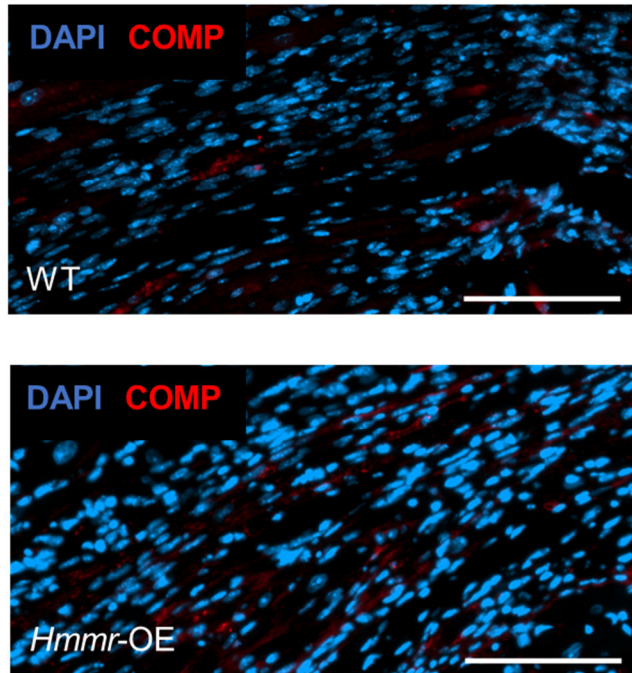
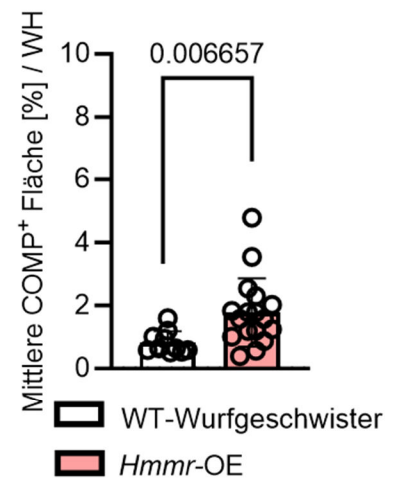
A**B**

Abbildung 36: Immunhistochemische Bestimmung des COMP - Gehaltes in *Hmmr*-OE Mäusen 1 Woche nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen COMP immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der COMP-gefärbten Schnitte in *Hmmr*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtypen (WT). **B**, Quantifizierung der COMP-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=11,18; *p<0,05, **p<0,01.

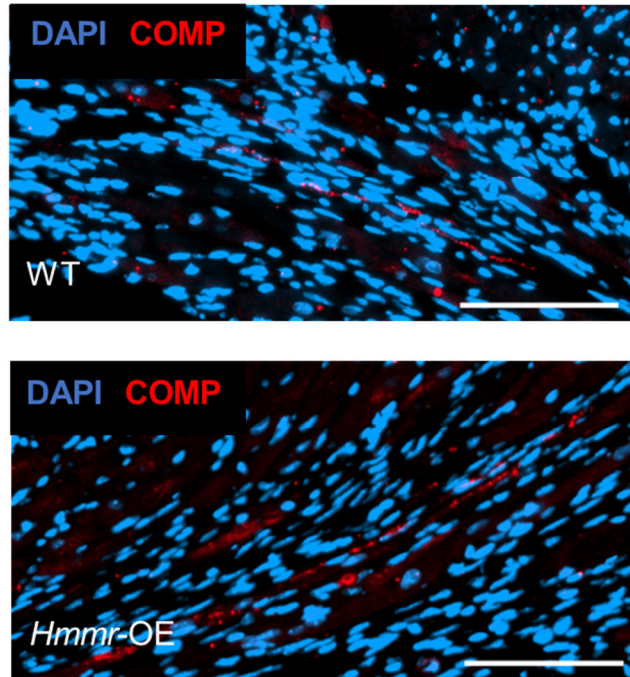
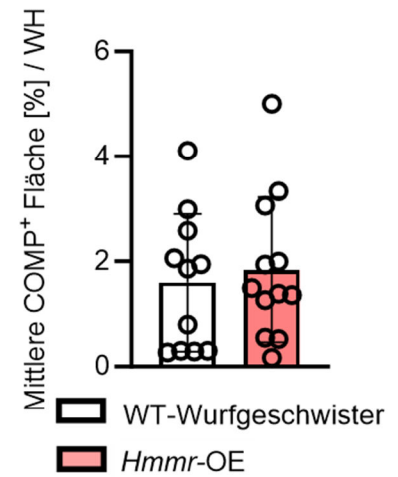
A**B**

Abbildung 37: Immunhistochemische Bestimmung des COMP – Gehaltes in *Hmnr*-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen COMP immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der COMP-gefärbten Schnitte in *Hmnr*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtypieren (WT). **B**, Quantifizierung der COMP-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=11,12.

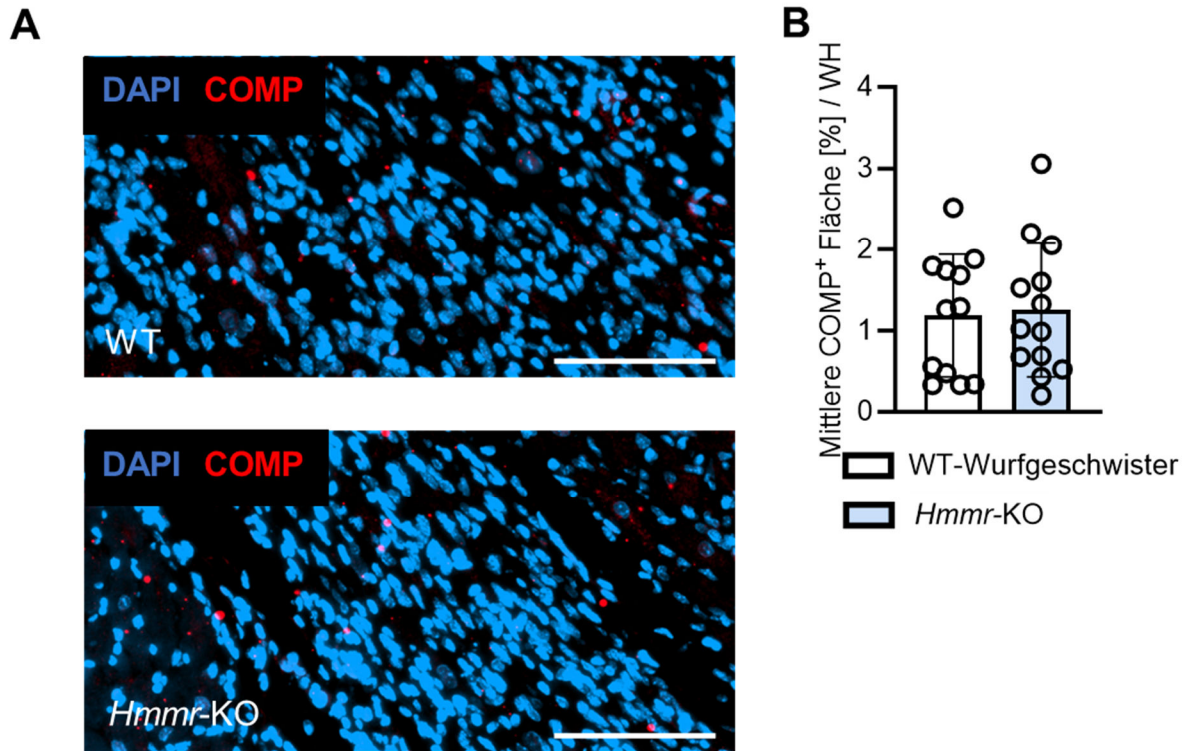


Abbildung 38: Immunhistochemische Bestimmung des COMP – Gehaltes in *Hmnr*-KO Mäusen 1 Woche nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen COMP immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der COMP-gefärbten Schnitte in *Hmnr*-KO Mäusen und den dazugehörigen Wildtypieren (WT). **B**, Quantifizierung der COMP-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=12,13.

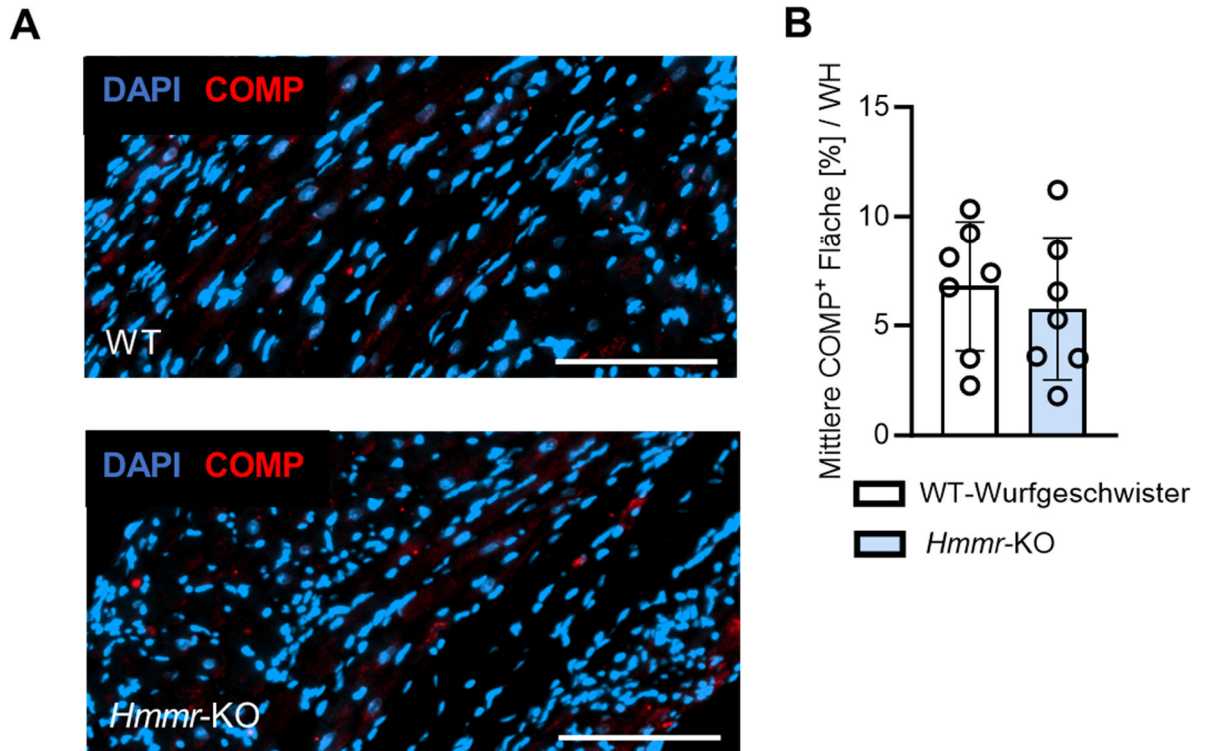


Abbildung 39: Immunhistochemische Bestimmung des COMP – Gehaltes in *Hmnr*-KO Mäusen 3 Wochen nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen COMP immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der COMP-gefärbten Schnitte in *Hmnr*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtypen (WT). **B**, Quantifizierung der COMP-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=7,7.

3.7.3.6 Hyaluronsäure

Wie unter 1.3.1 beschrieben handelt es sich bei der Hyaluronsäure um ein Glykosaminoglykan, welches essenziell für die Wundheilung ist und auch nach Myokardinfarkt hochreguliert ist. Je nach Kettenlänge kann es dabei unterschiedliche Signaltransduktionswege in Gang setzen und damit unterschiedliche Funktionen erfüllen. HA unterstützt dabei als wichtigster Bestandteil der EZM die Bildung des Narbengewebes und das kardiale *Remodeling*.

Für die *Hmnr*-OE Mäuse wurde Hyaluronsäure 72 Stunden, 1 Woche und 3 Wochen nach Infarkt angefärbt. 72 Stunden nach Infarkt sind keine Unterschiede ersichtlich (Abbildung 40), wohingegen die Herzen der *Hmnr*-OE Mäuse 1 Woche nach Infarkt signifikant weniger Hyaluronsäure aufweisen (Abbildung 41). 3 Wochen nach Infarkt nivelliert sich dieser Unterschied wieder (Daten nicht gezeigt).

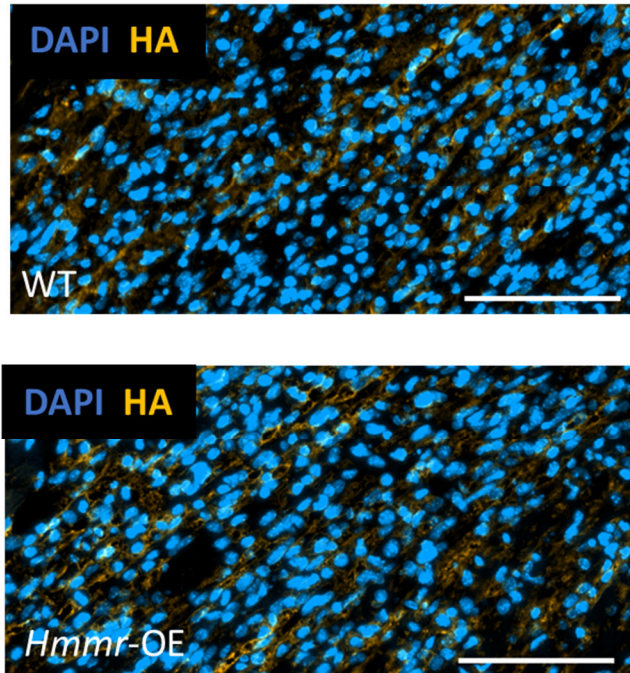
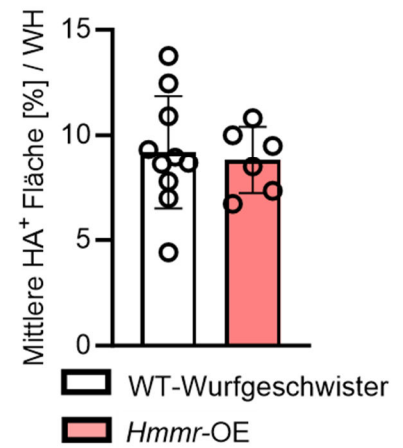
A**B**

Abbildung 40: Immunhistochemische Bestimmung des HA - Gehaltes in *Hmmer*-OE Mäusen 72h nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe des HA-bindenden Proteins immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der HA-gefärbten Schnitte in *Hmmer*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtyptieren (WT). **B**, Quantifizierung der HA-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=10,6.

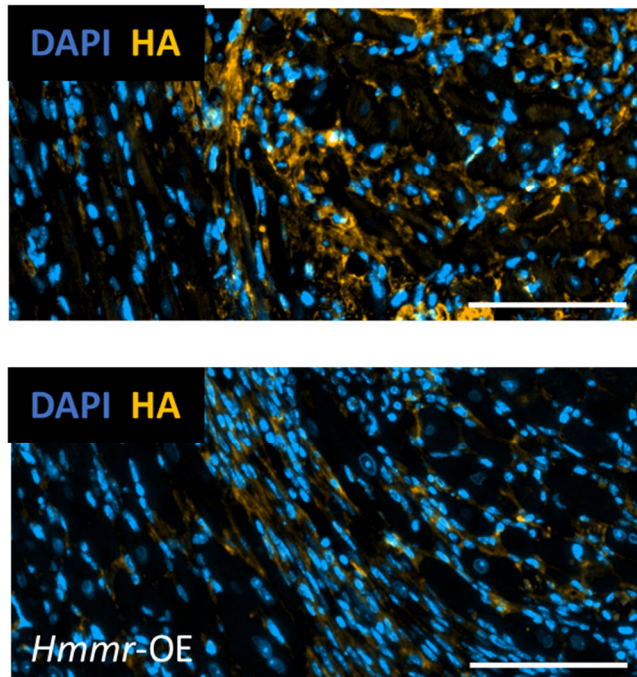
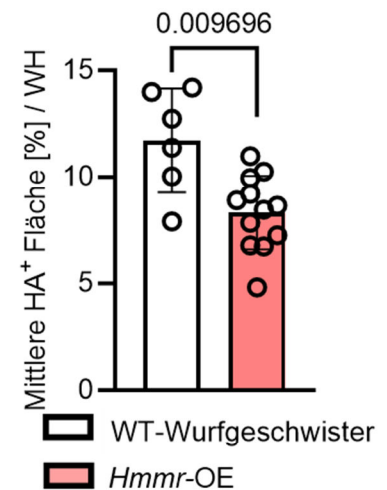
A**B**

Abbildung 41: Immunhistochemische Bestimmung des HA - Gehaltes in *Hmmer*-OE Mäusen 1 Woche nach (I/R). Das Herzgewebe wurde mit Hilfe des HA-bindenden Proteins immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der HA-gefärbten Schnitte in *Hmmer*-OE Mäusen und den dazugehörigen Wildtyptieren (WT). **B**, Quantifizierung der HA-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=6,12; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Auch für die *Hmmer*-KO Mäuse wurde eine Hyaluronsäurefärbung durchgeführt, hier für die Zeitpunkte 1 Woche und 3 Wochen nach I/R. Zu beiden Zeitpunkten konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen ermittelt werden (Abbildung 42 und 43).

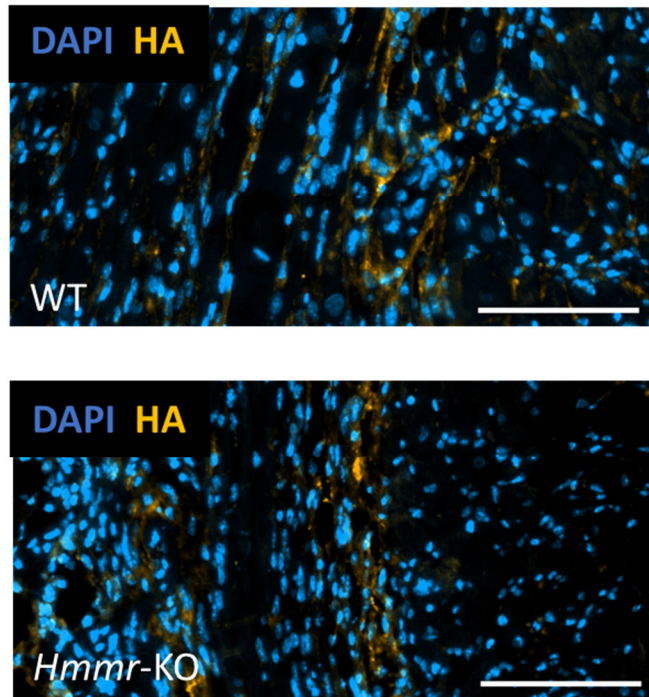
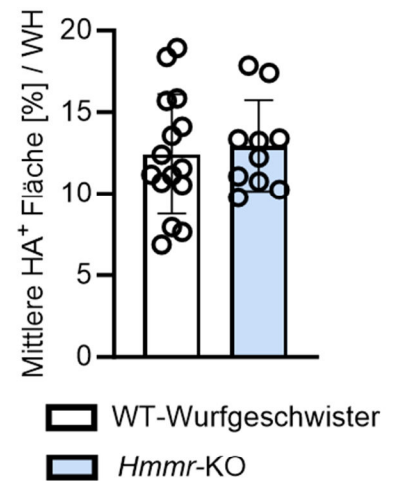
A**B**

Abbildung 42: Immunhistochemische Bestimmung des HA – Gehaltes in *Hmnr*-KO Mäusen 1 Woche nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe des HA-bindenden Proteins immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der HA-gefärbten Schnitte in *Hmnr*-KO Mäusen und den dazugehörigen Wildtypen (WT). **B**, Quantifizierung der HA-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=15,10.

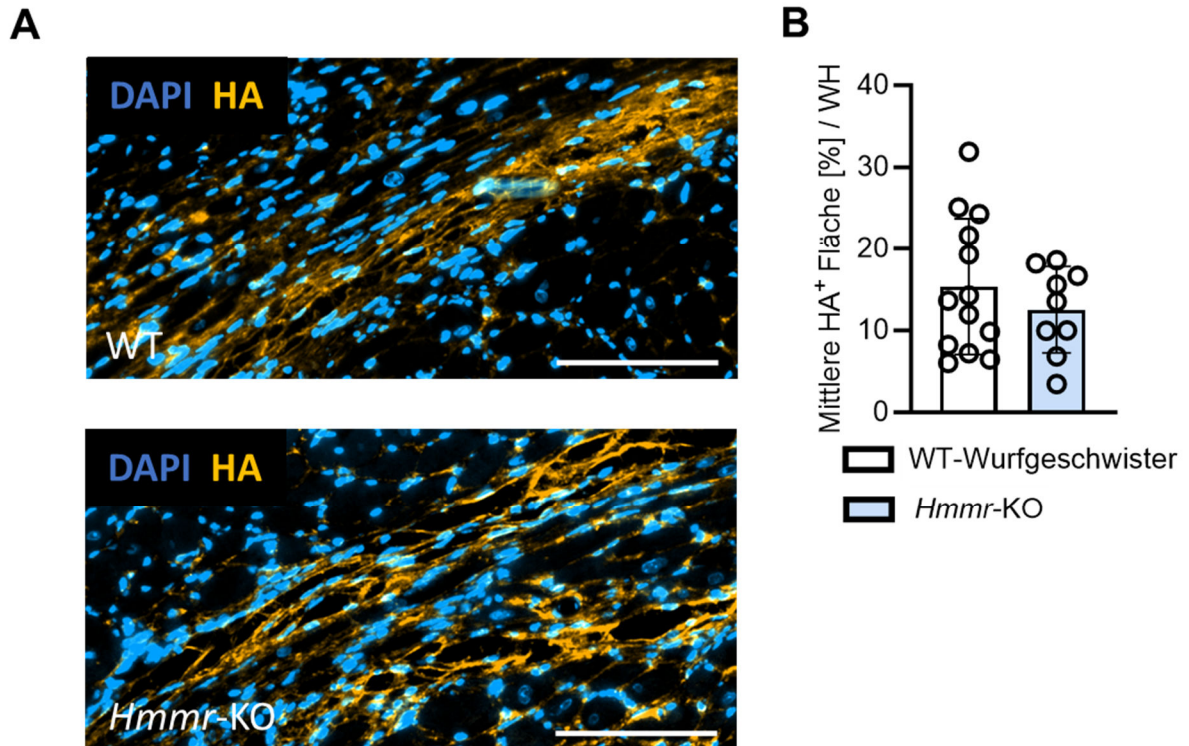


Abbildung 43: Immunhistochemische Bestimmung des HA – Gehaltes in Hmnr-KO Mäusen 3 Woche nach I/R. Das Herzgewebe wurde mit Hilfe des HA-bindenden Proteins immunhistochemisch angefärbt. Die positive Fläche wurde mittels *ImageJ* und eines Macros halbautomatisch quantifiziert. **A**, Repräsentative Bilder der HA-gefärbten Schnitte in Hmnr-KO Mäusen und den dazugehörigen Wildtypieren (WT). **B**, Quantifizierung der HA-positiven Fläche im gesamten Herzen (*whole heart* = WH). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=13,9

3.8 Einfluss der Überexpression von RHAMM auf die Immunantwort

72 Stunden nach I/R

Da bereits bekannt ist, dass RHAMM einen Einfluss auf die Zellproliferation und Migration haben kann und eine Überexpression den Phänotyp positiv beeinflusst, wurde im Nachgang zusätzlich noch die Immunzellantwort durchflusszytometrisch untersucht. Der Fokus lag dabei nicht nur beim Herzen, sondern auch das Blut, das Knochenmark und die Milz wurden 72 Stunden nach I/R untersucht, um auch die „Kommunikation“ anderer Organe mit dem Herzen nach I/R zu berücksichtigen, aus denen Immunzellen ebenfalls rekrutiert werden können.

3.8.1 Blut

Mit Untersuchung des Blutes lassen sich zirkulierende Immunzellen genauer untersuchen. Da es sich bei den *Hmnr*-OE Mäusen um eine globale Überexpression von RHAMM handelt, die von Beginn an besteht, sind Unterschiede innerhalb der Embryogenese nicht auszuschließen. Aus diesem Grund wurde das Blut, wie unter 2.5.1 beschrieben, nicht infarzierter Mäuse untersucht (Daten nicht gezeigt) bei denen sich keine Unterschiede zeigten. Im Anschluss wurde die Anzahl zirkulierender Zellen von Mäusen 72 Stunden nach Infarkt untersucht. Auch

hier konnten keine signifikanten Unterschiede in den Immunzellpopulationen analysiert werden (Daten nicht gezeigt). Das Gatingschema ist in Appendix 1 dargestellt.

3.8.2 Milz

Im nächsten Schritt wurde dann die Milz, wie unter 2.5.2 beschrieben, untersucht. Diese stellt ein wichtiges Organ in der Immunantwort dar, da aus ihr ein Großteil der Monozyten in das infarzierte Gebiet rekrutiert werden. Auch hier konnten keine Unterschiede in den Immunzellpopulationen analysiert werden (Abbildung 44). Das Gatingschema ist in Appendix 1 dargestellt.

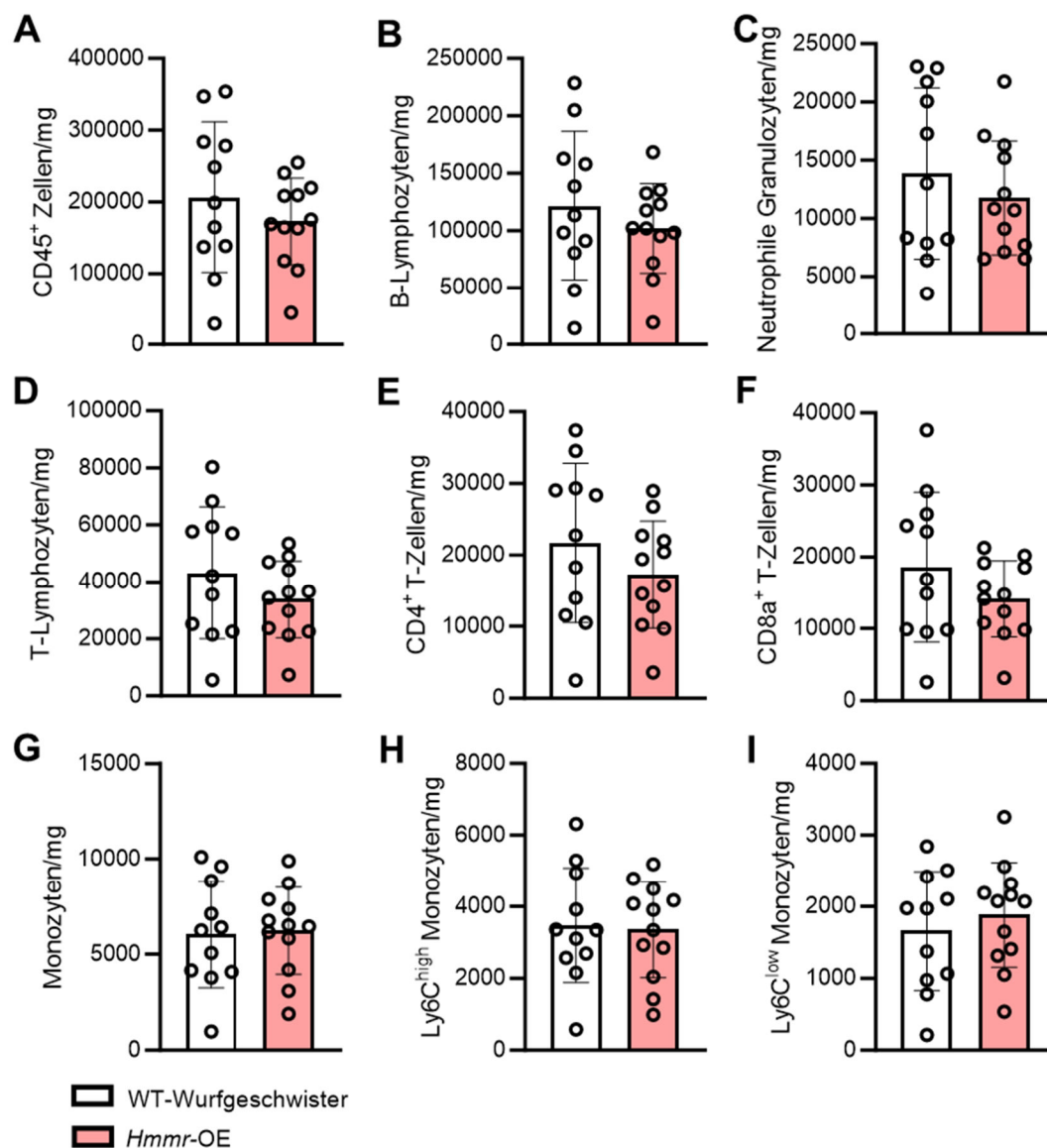


Abbildung 44: Durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellen der Milz 72 Stunden nach Infarkt für die *Hmnr*-OE Mäuse. Dargestellt sind die absoluten Zahlen, die auf das Gewicht der Milz normalisiert wurden. **A**, Gesamtleukozyten (CD45⁺ Zellen). **B**, B-Lymphozyten (CD45⁺, CD19⁺). **C**, Neutrophile Granulozyten (CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁺). **D**, T-Lymphozyten (CD45⁺, CD3⁺). **E**, T-Helferzellen (CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺). **F**, zytotoxische T-Zellen (CD45⁺, CD3⁺, CD8a⁺). **G**, Gesamtmonozyten (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺). **H**, Ly6C^{high} Monozyten (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺, Ly6C^{high}) und **I**, Ly6C^{low} Monozyten (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺, Ly6C^{low}). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; n=11, 12.

3.8.3 Herz

Auch das Herz wurde postmortal entnommen und wie unter 2.5.4 beschrieben untersucht. Auch in diesem Organ waren keine Unterschiede ersichtlich (Abbildung 45). Das Gatingschema ist in Appendix 2 dargestellt.

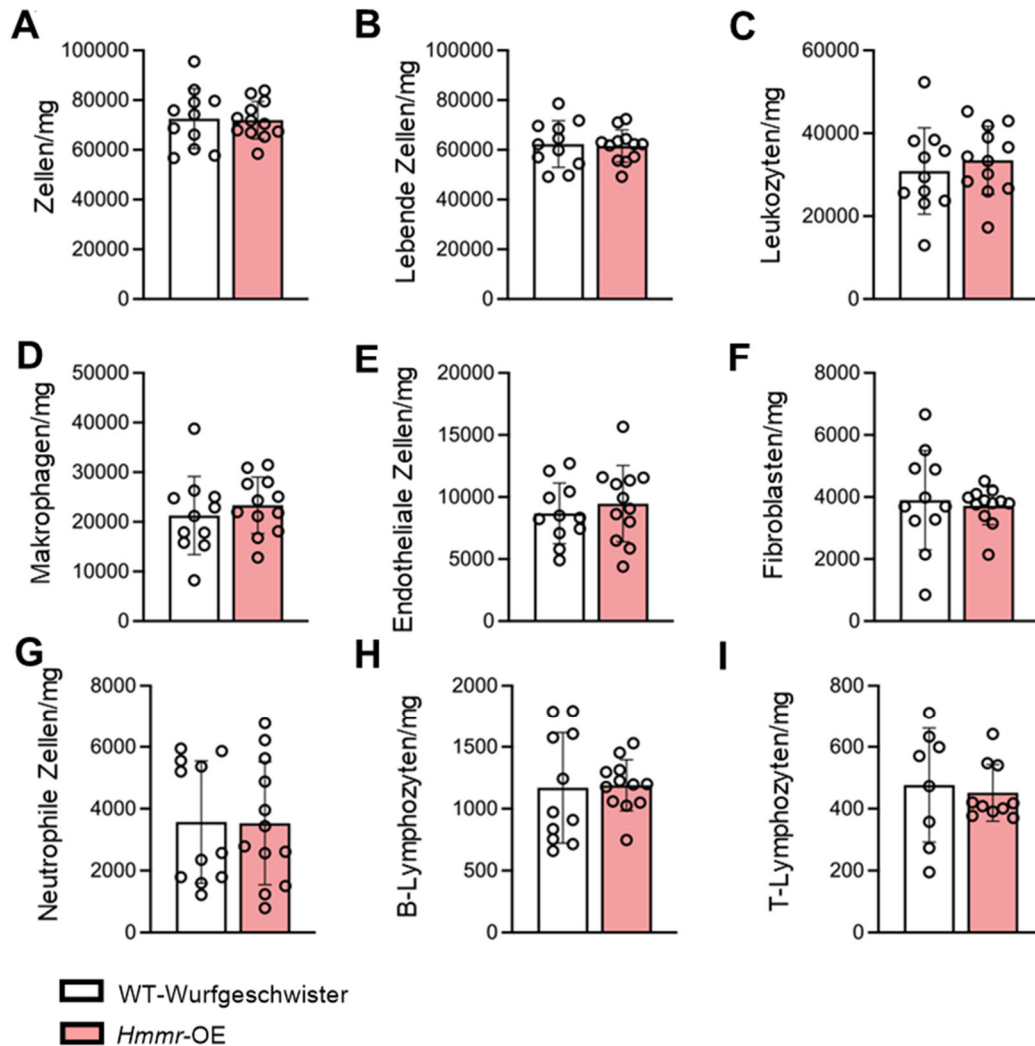


Abbildung 45: Durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellen des Herzens 72 Stunden nach Infarkt für die *Hmmer*-OE Mäuse. Dargestellt sind die absoluten Zahlen, die auf das Gewicht des jeweiligen Herzens normalisiert wurden. **A**, Alle Zellen. **B**, Lebende Zellen. **C**, Gesamtleukozyten (CD45⁺ Zellen). **D**, Makrophagen (CD45⁺, CD11b⁺, CD64⁺). **E**, Endotheliale Zellen (CD45⁺ CD31⁺). **F**, Fibroblasten (CD45⁺ CD31⁺ ITGA7⁺ MESFK4⁺). **G**, Neutrophile Granulozyten (CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁺). **H**, B-Lymphozyten (CD45⁺, CD19⁺) und **I**, T-Lymphozyten (CD45⁺, CD3⁺). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; n=11, 12. Die Analyse dieser Daten erfolgte durch Dr. Anne Petz.

3.9 Knochenmark

Wie unter 2.5.3 beschrieben, wurde auch das Knochenmark durchflusszytometrisch untersucht, da auch aus dem Knochenmark viele Immunzellen nach Infarkt rekrutiert werden. Auch hier konnten keine Unterschiede in den Immunzellpopulationen ermittelt werden (Abbildung 46). Das Gatingschema ist in Appendix 1 dargestellt.

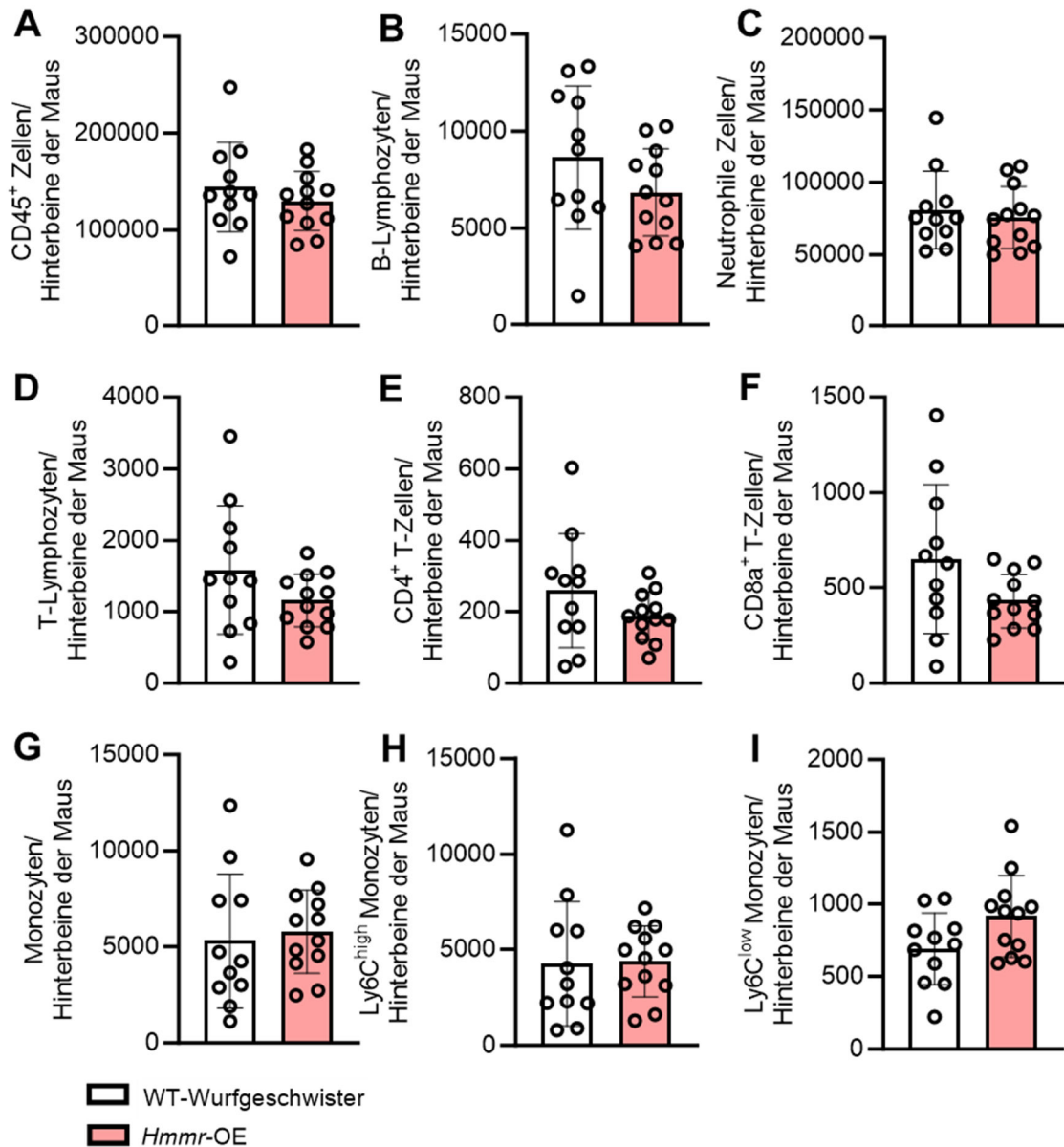


Abbildung 46: Durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellen des Knochenmarks 72 Stunden nach Infarkt für die Hmnr-OE Mäuse. Dargestellt sind die absoluten Zahlen, die auf das Knochenmark beider Hinterbeine normalisiert wurden. **A**, Gesamtleukozyten (CD45⁺ Zellen). **B**, B-Lymphozyten (CD45⁺, CD19⁺). **C**, Neutrophile Granulozyten (CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁺). **D**, T-Lymphozyten (CD45⁺, CD3⁺). **E**, T-Helferzellen (CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺). **F**, zytotoxische T-Zellen (CD45⁺, CD3⁺, CD8a⁺). **G**, Gesamtmonozyten (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺). **H**, Ly6Chigh Monozyten (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺, Ly6C^{high}) und **I**, Ly6C^{low} Monozyten (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺, Ly6C^{low}). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; n=11, 12.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass auf Immunzelebene 72 Stunden nach I/R keine Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Genotypen bestehen.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle von RHAMM auf den Infarktphänotyp und die Heilung nach kardialer Ischämie und Reperfusion (I/R) in zwei verschiedenen Mausmodellen untersucht. Dazu wurden sowohl Tiere mit einer globalen Überexpression als auch mit einem globalen *Knockout* von RHAMM verwandt. Zur Induktion der Ischämie wurden diese Tiere in einem Alter von 8-12 Wochen einer operativen Intervention unterzogen, wobei die *LAD* für 45 Minuten verschlossen wurde. Durchgeführt wurde die Operation bei einem geschlossenen Thorax, um den Infarkt möglichst nahe dem eines Menschen zu imitieren. Es folgte eine Reperfusion, welche ebenfalls mit einer PCI beim Menschen und dem damit verbundenen Reperfusionsschaden vergleichbar ist. Im Anschluss wurden Herzen dieser Mäuse sowohl echokardiografisch, histologisch als auch durchflusszytometrisch zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht.

Aktuell zeigen die Todeszahlen aus dem Jahre 2023, dass Herz-Kreislauf-Erkrankungen und deren Folgen die häufigste Todesursache in Deutschland darstellen. Auch in der Zukunft ist damit zu rechnen, dass dies so bleiben wird. Zum einen, weil die Bevölkerung immer älter wird und auch, weil v.a. in den Industrieländern ein zunehmend inaktiver und ungesunder Lebensstil die Regel darstellt.

Ein frühes Eingreifen in den Lebensstil wäre daher eine gute präventive Maßnahme, um Risikofaktoren und damit die Wahrscheinlichkeit für Herz-Kreislauferkrankungen und deren Folgen zu minimieren. Kommt es dennoch zu einem Myokardinfarkt steht an primärer Stelle eine schnelle Revaskularisierung im Vordergrund, gefolgt von der Einnahme zahlreicher Medikamente, die laut Leitlinie für eine Sekundärprophylaxe vorgesehen sind²⁰⁶. Dazu zählen Statine, β -Blocker, ACE-Hemmer (u.a.), ASS oder Clopidogrel und Protonenpumpenhemmer²⁰⁶. Obwohl es in den letzten Jahrzehnten deutliche Fortschritte im Bereich der Kardiologie gab und mit den oben genannten Methoden zahlreiche Leben gerettet werden konnten, kann ein Absterben der Kardiomyozyten und das damit zusammenhängende *Remodeling* nach Ischämie bisher nicht verhindert oder deutlich minimiert werden.

Gerade deshalb spielt die Forschung in diesem Bereich eine so wichtige Rolle. Wir konnten mit dieser Studie die Vorteile einer RHAMM Überexpression nach I/R nachweisen. Ob und in welchem Maße RHAMM dabei pharmakotherapeutisch adressierbar sein könnte, bedarf weiterer Forschungsarbeiten.

4.1 Auswirkung der RHAMM-Überexpression auf die Herzfunktion nach I/R

In den echokardiografischen Untersuchungen konnten wir für die *Hmmr*-OE Mäuse im Vergleich zu dem Wildtyp keine Unterschiede in den gemessenen Parametern feststellen, obwohl wir nach Auswertung der Gomori-Trichrom und Picro-Siriusrot Färbung Hinweise auf eine kleinere Narbe erhalten haben. Ebenfalls wurden MRT-Messungen durchgeführt, welche jedoch im Ergebnis keine Unterschiede aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Allerdings konnte in den *Hmmr*-KO Mäusen eine größere Narbe nachgewiesen werden, welche mit einer verschlechterten Herzfunktion einherging. Diese Ergebnisse legen nahe, dass RHAMM eine essenzielle Rolle beim *Remodeling* und der Herzfunktion nach I/R spielt.

Es ist möglich, dass der Zeitpunkt 3 Wochen nach I/R in den *Hmmr*-OE Mäusen noch zu früh ist, um signifikante Unterschiede mit der von uns verwandten Methode messen zu können. Es ist denkbar, dass Messungen bis zu 8 Wochen nach I/R Unterschiede aufzeigen würden.

Eine weitere Vermutung ist, dass die Unterschiede in den *Hmmr*-OE Mäusen möglicherweise so gering sind, dass sie mit der konventionellen Echo-Methode nicht nachweisbar sind. Eine weitere Möglichkeit wäre die Durchführung einer myokardialen *Strain*-Analyse. Dabei handelt es sich vereinfacht beschrieben um eine Methode, bei der die Myokarddehnung zur Quantifizierung der Funktion des linken Ventrikels herangezogen wird²⁰⁷. Ein sehr gut bewerteter Parameter dieser Analyseverfahren ist die globale longitudinale Dehnung (GLS), welche auch in der Klinik Anwendung findet. Sie wird bei Patienten empfohlen, die sich einer Chemotherapie unterziehen, um eine Abnahme der linksventrikulären Funktion zu erkennen, bevor die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) sinkt²⁰⁷.

In unserer Studie könnte diese Analyseverfahren mit den bereits vorhandenen echokardiografischen Daten vorgenommen werden.

4.2 Die Rolle von RHAMM in der kardialen Fibrose

Wie bereits dargelegt, konnte in den *Hmmr*-OE-Mäusen eine geringere Narbenbildung sowohl mittels Gomori- als auch der Picro-Siriusrot-Färbung nachgewiesen werden. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde zudem der Gesamt-Kollagengehalt sowie die Packungsdichte der Kollagenfasern analysiert. In den *Hmmr*-OE Mäusen konnte 1 Woche nach Infarkt ein tendenziell höherer Kollagengehalt nachgewiesen werden. Nach 3 Wochen wies die Gruppe jedoch einen signifikant niedrigeren Wert auf als die Kontrollgruppe.

Bereits in einer Studie von Mamatha Damodarasamy *et al.* aus dem Jahr 2014 wurde gezeigt, dass Hyaluronsäure (HA) in der Wundheilung eine entscheidende Rolle spielt²⁰⁸. Die Eigenschaft von RHAMM als HA-Rezeptor erlaubt die Ableitung einer Kausalität in der Signaltransduktionskaskade. Die oben genannte Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass HA in einer bestimmten Kettenlänge die Produktion von Kollagen I und III erhöht²⁰⁸. Genau diese beiden Kollagene wurden mit Hilfe der Picro-Siriusrot Färbung angefärbt und ausgewertet. Wie unter 3.7.3.6 dargelegt, ist in den *Hmmr*-OE Mäusen eine Reduktion der HA-Konzentration 1 Woche

nach Infarkt sowie eine verminderte Kollagenbildung im Sirius-Rot-Färbeverfahren zu beobachten (s. 3.6). In der Konsequenz lässt sich ableiten, dass entweder eine verminderte HA-Produktion oder eine erhöhte HA-Degradation zu einer Reduktion von Kollagenfibrillen des Typs I und III führt. Auch die Ergebnisse der *single cell* Analyse wiesen auf eine verminderte Genexpression von Kollagen I und III hin, welches jedoch lediglich kumuliert in der Picro-Siriusrot Färbung histologisch nachgewiesen werden konnte. Eine separate immunhistochemische Färbung von Kollagen I und III wurde nicht durchgeführt. Auch für andere Kollagen-Subtypen ergaben sich aus der *single cell* Analyse Hinweise auf eine signifikante Regulation, die jedoch mit anderen Methoden lediglich für Kollagen V und VI näher untersucht wurde. Hierbei konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede für beide letztgenannten Kollagene in der immunhistochemischen Auswertung festgestellt werden.

4.3 RHAMM beschleunigt die Fibroblastenreifung

Wie unter 1.2.3 dargelegt, kommt den kardialen Fibroblasten eine entscheidende Bedeutung für die Narbenbildung nach I/R zu, weshalb sie für den Heilungsprozess von essenzieller Relevanz sind. Da RHAMM die Migration von Immunzellen und die Proliferation von Fibroblasten fördert, ist es denkbar, dass RHAMM-überexprimierende Fibroblasten schneller ins infarzierte Myokard einwandern und somit die Narbenbildung beschleunigen. Ein konditionelles Mausmodell mit fibroblastenspezifischer Überexpression von RHAMM könnte diese Frage klären.

Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wird durch zwei zusammenwirkende Signalwege gesteuert, den TGF β -R/SMAD Signalweg und die HA-vermittelte RHAMM:CD44:EGFR-Signalkaskade. Dabei müssen beide Wege der Signalübermittlung aktiviert sein, um die Differenzierung von Myofibroblasten einzuleiten²⁰⁹. In der *single cell* Analyse ergaben sich Hinweise auf eine beschleunigte Fibroblastenreifung zu Matrifibrozyten in den *Hmmr*-OE Mäusen. Aufgrund dieses „Fibroblasten-switches“ gehen wir davon aus, dass die Fibroblasten in den *Hmmr*-OE Mäusen insgesamt einen schnelleren Lebenszyklus durchlaufen. Hinzu kommt, dass diese Fibroblasten eine verminderte Expression von Genen, die im Zusammenhang mit der Kollagenfibrillogenese stehen, aufweisen, aber eine erhöhte Expression von Genen, welche für die Organisation der Kollagenfibrillen verantwortlich sind. Weiterhin wurde eine erhöhte Expression von Markern der Matrifibrozyten gemessen, zum Beispiel von Decorin, Dermato pontin, CCN2, CCN5 und COMP. Wie unter 3.7 beschrieben, wurden diese 1 Woche und 3 Wochen nach I/R zusätzlich histologisch auf Proteinebene untersucht. Auf diese Weise konnte eine vermehrte Bildung von COMP 1 Woche nach Infarkt detektiert werden. Eine Diskussion dieser Ergebnisse ist unter 4.4 zu finden.

4.4 COMP-Akkumulation in den *Hmmr*-OE Mäusen

Bei COMP handelt es sich um das sogenannte *Cartilage oligomeric matrix protein*, eine Komponente der EZM und essenziell für den Kollagenaufbau²⁰⁵. COMP ist ein matrizelluläres Protein und ein Marker der Matrifibrozyten, also der „späten“ Fibroblasten²¹⁰. Wie bereits oben erwähnt gehen wir davon aus, dass die Fibroblasten in den *Hmmr*-OE Mäusen schneller zu Matrifibrozyten differenzieren und so den Lebenszyklus schneller durchlaufen. Somit zeigen die *Hmmr*-OE Mäuse bereits 1 Woche nach I/R signifikant veränderte und relativ hohe COMP-Level, verglichen zum WT. Da COMP an der Synthese und Organisation der Kollagenfibrillen beteiligt ist, könnte eine Überexpression von COMP in den *Hmmr*-OE Mäusen zur effizienteren Wundheilung und schnelleren Narbenbildung führen.

COMP kann aufgrund seiner Struktur mit diversen Komponenten der EZM interagieren und an eine Vielzahl von Rezeptoren und Wachstumshormonen binden. Etabliert ist COMP als diagnostischer Marker im Zusammenhang mit der Umsetzung von Knorpelgewebe in den Gelenken²¹¹. Neuere Studien untersuchten COMP auch im Zusammenhang mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen, aber auch im Kontext der Fibrose in diversen Geweben²⁰⁵. Interessanterweise scheint COMP abhängig von Krankheit und Organ unterschiedliche Funktionen aufzuweisen²⁰⁵.

Aus der kardiologischen Forschung ist bekannt, dass COMP für das Herz-Kreislaufsystem einen protektiven Faktor darstellt. So konnte in einer Studie von Wang *et al.* aus dem Jahr 2022 eine positive Rolle von COMP bei der Kontrolle des Blutdruckes nachgewiesen werden²¹². Im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistertieren wiesen die COMP defizienten Tiere einen höheren Blutdruck auf sowie eine verschlechterte endothelabhängige Relaxation. Mechanistisch betrachtet kommt es zu einer direkten Interaktion von COMP mit Piezo1, wodurch die Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase und die Stickstoffmonoxidbildung erhöht wird²¹². Erwähnenswert ist überdies, dass insbesondere Patientinnen mit einer pulmonalen Hypertonie niedrige COMP-Plasmaspiegel aufweisen²¹³. In einer Studie aus dem Jahr 2013, in welcher COMP defiziente Tiere (männlich und weiblich) kardiologisch untersucht wurden, ließ sich die protektive Funktion von COMP nachweisen. In diesem Modell entwickelten die von Geburt an COMP defizienten Mäuse bereits im jungen Alter von 3-5 Monaten eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) inklusive einer verschlechterten Herzfunktion. Wurde der *Knockout* hingegen erst in einem Alter von 1 Monat induziert, entwickelten die Tiere eine Vielzahl von kardialen Defekten wie zum Beispiel eine Kardiomyozyten-Apoptose, einen Verlust an Myofilamenten, einen Connexin-43 Mangel und eine Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen. Auch in humanen DCM-Patienten konnte ein COMP-Mangel festgestellt werden²¹⁴. Hier zeigt sich, dass COMP durch die Interaktion mit EZM-Komponenten wie etwa Kollagen und TGF- β die Kollagensynthese und damit die Stabilität und Funktionalität des EZM-Netzwerkes fördert. Dies wurde ebenfalls in einer Studie

von Rosenberg *et al.* im Jahre 1998 thematisiert, in welcher die ionenabhängige Wechselwirkung von COMP mit (Pro)Kollagen I und II untersucht wurde²¹⁵.

Hinweise für einen Zusammenhang zwischen COMP und den abweichenden Kollagenmengen innerhalb der RHAMM Genotypen liefern neuere Studienergebnisse, die COMP im Kontext der Fibrose untersuchen. COMP stellt einen äußerst wichtigen Regulator für den Aufbau von Kollagenfibrillen dar²¹⁶. In einer Studie von Zahou *et al.* wurde gezeigt, dass der COMP-Serumspiegel als wichtiger Marker für den Grad der Leberfibrose bei Patienten mit chronischer Hepatitis dienen kann²¹⁶. Die Fibrose wird hepatisch über den CD36/MEK/ERK-Signalweg reguliert, wodurch es zu einer vermehrten Kollagen-I-Ablagerung in den Stellatzellen der Leber kommt²¹⁷. Auch andere Arbeitsgruppen konnten COMP als wichtigen diagnostischen Marker für eine Leberfibrose oder Zirrhose nachweisen^{216,218}. Auch bei der Erkrankung der idiopathischen Lungenfibrose scheint COMP eine wichtige Rolle zu spielen. So waren die COMP-Serumspiegel dieser Patienten signifikant erhöht und korrelierten mit einer Abnahme der Vitalkapazität²¹⁹. Durch ein *Silencing* von COMP in den Lungenfibroblasten konnte dabei unter anderem die TGF- β 1 induzierte Kollagen1A1-Aktivität gehemmt werden²¹⁹.

Von anderen Arbeitsgruppen wurden auch *in vitro* Studien durchgeführt, welche einen Zusammenhang zwischen Fibroblasten und COMP adressieren. In einer Studie von Shuin Park *et al.* aus dem Jahre 2020 wurden dazu Untersuchungen an kardialen Fibroblasten vorgenommen²²⁰. Es kristallisierte sich unter anderem COMP als potenzieller Biomarker für eine kardiale Fibrose heraus. Interessanterweise stieg die COMP-Expression in den Fibroblasten nach vorheriger Aktivierung mittels TGF- β 1. Erwähnenswert ist ebenfalls, dass sich COMP in *in vitro* Untersuchungen in fibrotischen Regionen lokalisierte. Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe zeigen, dass COMP durch aktivierte Fibroblasten exprimiert und in die Region der Fibrose lokalisiert wird.

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass das Herz der *Hmmr*-OE Mäuse 1 Woche nach Infarkt im Vergleich zu dem Wildtyp signifikant mehr COMP aufweist und in der Sirius Rot Färbung zu diesem Zeitpunkt eine Tendenz zu mehr Kollagen zu erkennen ist. 3 Wochen nach Infarkt, als die Kollagenmenge in den *Hmmr*-OE Tieren signifikant erniedrigt war, sehen wir keine Unterschiede mehr im COMP-Level. Hinzuzufügen ist, dass für die *Hmmr*-KO Mäuse zu keinem Zeitpunkt Unterschiede im COMP-Gehalt der Herzen ermittelt werden konnte.

Zusammengefasst lässt sich vermuten, dass RHAMM die Expression von COMP durch eine Beschleunigung des Fibroblasten-Lebenszyklus innerhalb einer Woche nach Infarkt erhöht und somit eine schnellere bzw. effizientere Heilung ermöglicht. Möglicherweise kommt es durch den beschleunigten Fibroblasten-Lebenszyklus, zu einem früheren Peak der TGF- β 1 Sekretion. Dies könnte die Bildung des Matrifibrozytenmarkers COMP bereits 1 Woche nach I/R erhöhen und die kollagenhaltige Matrix so verändern, dass es in den *Hmmr*-OE Mäusen insgesamt zu einer kleineren Narbe nach I/R kommt.

Bisher gibt es keine Studien, die einen antifibrotischen Phänotyp von COMP im Herzen beschreiben. In anderen Organsystem ist ein COMP-Überschuss meist mit einer vermehrten Fibrose verbunden. Für unser Mausmodell lässt sich schlussfolgern, dass COMP nicht nur einen protektiven, sondern auch einen antifibrotischen Phänotyp nach Infarkt fördert.

4.5 Weniger HA in *Hmmr*-OE Mäusen 1 Woche nach I/R

Die immunhistochemische Analyse des HA-Gehalts der Herzen eine Woche nach Infarkt ergab in den *Hmmr*-OE Mäusen eine signifikante HA-Reduktion verglichen mit dem Wildtyp. 3 Wochen nach Infarkt bestand weiterhin eine Tendenz zur Reduktion, ohne allerdings Signifikanz zu erreichen (Daten nicht gezeigt). Warum es zu einem HA-Mangel in den *Hmmr*-OE Tieren kommt, kann mehrere Ursachen haben. Auf der einen Seite wäre eine Art negative Rückkopplung durch die Überexpression des HA Rezeptors RHAMM denkbar, in dem Sinne, dass weniger HA benötigt wird, um die gleiche Signalstärke zu erzielen wie bei einer normalen/physiologischen Verteilung und Menge von RHAMM.

Auf der anderen Seite wäre es auch möglich, dass RHAMM einen schnelleren Katabolismus der HA in Gang setzt. Obwohl HA je nach Kettenlänge eine pro- oder antiinflammatorische Funktion ausübt, wird bei den *Hmmr*-OE Mäusen ein protektiver Infarktphänotyp ersichtlich. Die genaue Kettenlänge der Hyaluronsäuren wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Wie genau sich eine Überexpression von RHAMM auf die HA-Produktion oder Degradation auswirkt, ist bisher nicht geklärt. In der *single cell* Analyse wurde dieser Einfluss noch nicht detailliert untersucht und bedarf weiterer Forschung. Interessant wäre es auch, die HA-Kettenlängen, sowohl in den *Hmmr*-OE als auch in den *Hmmr*-KO Mäusen zu untersuchen. Dies wäre beispielweise unter Verwendung von Plasma möglich, wobei die Molekularmassenverteilung von vorhandenem HA gemessen werden könnte²²¹. Möglicherweise weisen die *Hmmr*-OE Mäuse nicht nur weniger HA, sondern auch höher molekulares HA auf, welches protektiv und antiinflammatorisch nach I/R wirkt.

4.6 Vermehrte Expression von Dermatoportun in den *Hmmr*-OE Mäusen

In unserer Studie konnten wir einen signifikanten Anstieg von Dermatoportun in *Hmmr*-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R nachweisen.

Bereits 2002 wurde von Takemoto *et al.* erstmals eine Regulation der Dermatoportun mRNA Expression nach Infarkt in Ratten beschrieben. Dabei wurden die Daten mit nicht infarzierten Tieren verglichen und die mRNA Expression 2, 7, 14 und 28 Tage nach I/R parallel mit der Expression der Decorin und Kollagen I mRNA untersucht²²². Erst ab dem 7. Tag nach Infarkt konnte eine erhöhte Expression von Dermatoportun im Herzen nachgewiesen werden. Dies erklärt möglicherweise, warum wir in unserem Mausmodell 7 Tage nach I/R noch keine Unterschiede auf Proteinebene feststellen konnten, 3 Wochen nach Infarkt jedoch schon.

Während Takemoto *et al.* parallel noch eine erhöhte Expression der Decorin und Kollagen I mRNA nachweisen konnten, konnten wir auf Proteinebene keine Hinweise auf deren Regulation detektieren.

2013 haben Liu *et al.* die Rolle von Dermato pontin für die Adhäsion, Migration und Proliferation von Kardiomyozyten (CMs) und Herzfibroblasten (CFs) neonataler Ratten *in vitro* untersucht²²³. Dabei wurden die mRNA und Proteinlevel von Dermato pontin sowie dessen Sekretion in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten (CMs) und Herzfibroblasten (CFs) unter Hypoxie- und Serumentzugbedingungen (Hypoxie/SD) analysiert. Die Arbeitsgruppe konnte eine Rolle von Dermato pontin bei der Adhäsion und Migration von Fibroblasten nachweisen, jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Hypoxie/SD die Expression und Sekretion von Dermato pontin in CMs und CFs stimuliert²²³. Es ist daher denkbar, dass genau dieser Mechanismus auch im Model der myokardialen Ischämie zum Tragen kommt. Auch hier führen möglicherweise die hypoxischen Bedingungen und der Nährstoffmangel nach I/R zu einer gesteigerten Synthese und Sekretion von Dermato pontin.

Nun stellt sich die Frage, wie eine Überexpression von RHAMM mit einer vermehrten Synthese von Dermato pontin in Zusammenhang stehen könnte. Die Arbeitsgruppe von Taeyeon Kim *et al.* stellte im Jahre 2019 fest, dass Dermato pontin zu einer verbesserten Zelladhäsion und zu einer reduzierten Zellproliferation führt. Überdies fördert Dermato pontin die Myoblastendifferenzierung in C2C12-Zellen²²⁴. Wie genau es dazu auf zellulärer Ebene kommt und welche Signalkaskaden dem zugrunde liegen, konnte hier nicht geklärt werden.

G.P. Sidgwick *et al.* beschreibt in seinen Untersuchungen aus dem Jahre 2011, dass die Bildung von Dermato pontin durch TGF- β gefördert und durch IL-4 gehemmt werden kann²²⁵. In einer Studie von S. K. Samuel *et al.* aus dem Jahre 1993 konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der RHAMM:HA Interaktion, die TGF- β vermittelte Zellmigration hemmt²²⁶.

Man könnte vermuten, dass RHAMM über eine bisher unbekannte Signalkaskade die Bildung von TGF- β fördert. Möglich wäre, dass eine Überexpression von RHAMM durch die Interaktion mit HA in einer bestimmten Kettenlänge, welche es noch zu untersuchen gilt (s. 4.5), zu einer vermehrten Bildung von TGF- β 1 und damit zu einer verstärkten Aktivierung des dazugehörigen Signalweges führt. Dies wiederum könnte die Expression von Dermato pontin und damit die geordnete und protektive Narbenbildung in den *Hmmr*-OE Mäuse erklären.

Alternativ könnte RHAMM auch unabhängig von einer erhöhten TGF- β Konzentration den TGF- β Signalweg beeinflussen, zum Beispiel über eine Interaktion mit dem TGF- β 1 Rezeptor (TGF β R1). Wie für eine Reihe von Rezeptoren einschließlich CD44 und PDGFR, ist auch für TGF β R1 eine Interaktion mit RHAMM nachgewiesen worden²²⁷. Auch wenn diese Studie im Kontext der Angiogenese mit Endothelzellen durchgeführt wurde, ist es plausibel, dass auch

in Fibroblasten die Interaktion von RHAMM und TGF β R1 zu einer erhöhten Aktivität des TGF β Signalweges und damit zu einer gesteigerten Dermatoportun-Expression führt.

Zusammenfassend scheint Dermatoportun als Bestandteil der EZM eine Rolle bei dieser und der Organisation der fibrillären Kollagenmatrix zu spielen²²². Inwieweit Dermatoportun einen Einfluss auf das *Remodeling* hat und warum gerade eine Überexpression von RHAMM zu einer gesteigerten Synthese von Dermatoportun führt, bleibt offen. Möglicherweise kommt es durch die Überexpression von RHAMM zu einer vermehrten Bildung von TGF- β oder über die Interaktion von RHAMM mit TGF β R1 zu einer erhöhten Aktivität des Signalweges und damit zu einer gesteigerten Synthese von Dermatoportun. Dieses könnte die Organisation der Kollagenfibrillen fördern und so die Heilung des Myokards nach I/R unterstützen.

4.7 Limitierung und Schlussfolgerung

Der genaue Mechanismus, welcher zu einer kleineren Narbe nach Infarkt bei den *Hmmr*-OE Mäusen führt, konnte in dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden. Durch die globale Überexpression von RHAMM ließen sich Auswirkungen auf die einzelnen Zelltypen nur mit Hilfe der *single cell* Analyse ermitteln. Dies war die Grundlage für die weiteren histologischen Untersuchungen. Hier ergaben sich Hinweise auf eine schnellere Fibroblastendifferenzierung zu Myofibroblasten bzw. Matrifibrozyten und es gab mehrere Hinweise auf eine Regulation von Genen, welche eine Rolle in der Interaktion und Strukturierung der Kollagene bilden. Immunhistochemisch konnte dies nur für COMP und Dermatoportun nachgewiesen werden. Während COMP 1 Woche nach Infarkt signifikant erhöht ist und einen Marker der „späten“ Myofibroblasten oder auch Matrifibrozyten darstellt, ist Dermatoportun 3 Wochen nach I/R in den *Hmmr*-OE Mäusen signifikant erhöht. Die Menge an HA ist in den *Hmmr*-OE Mäusen 1 Woche nach I/R signifikant verringert. Die genaue Funktion dieser Strukturen im Zusammenhang mit RHAMM konnte hier jedoch nicht geklärt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Bedeutung von RHAMM für die Regulation der Heilung nach einem Myokardinfarkt. Eine Überexpression von RHAMM führt durch eine schnellere Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten in der proliferativen Phase nach I/R zu einer verminderten Fibrose, was durch einen verminderten Kollagengehalt in der Narbe nach I/R untermauert wird. Die Überexpression der Modulatoren Dermatoportun und COMP verbessert ebenfalls die Integrität und Funktionalität der Narbe, indem sie die Narbe so organisiert, dass sie nicht „versteift“ und somit eine effektivere Funktion des Herzmuskels ermöglicht. Inwieweit sich dies auf die Herzfunktion der *Hmmr*-OE Mäuse auswirkt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Diese Erkenntnisse könnten neue Ansätze für therapeutische Strategien zur Verbesserung der Herzheilung nach einem Myokardinfarkt bieten. Dies bedarf jedoch noch weiterer Forschung und der Identifikation des genauen Mechanismus. Ein möglicher Ansatz wäre eine

Fibroblasten-spezifische Überexpression bzw. ein *Knockout*, um die Rolle von RHAMM bei der Heilung nach Myokardinfarkt näher zu untersuchen.

Möglicherweise könnte RHAMM sich auch als prognostischer Marker erweisen, der mit der Schwere des Schadens nach MI und dem Ausmaß der Gewebeheilung korreliert.

4.8 Zusammenhang zwischen erhöhter Dermatoportun-Synthese und vermindertem Hyaluronsäuregehalt der *Hmmr*-OE Mäuse

Eine weitere offene Frage ist, ob die erhöhte Dermatoportun-Synthese auch mit dem verminderten HA-Gehalt in den *Hmmr*-OE Mäusen in Zusammenhang stehen könnte. Dabei wäre es interessant, zunächst die HA:CD44 vermittelte Dermatoportun-Expression zu untersuchen, zum Beispiel in *CD44* defizienten Mäusen. Denkbar ist, dass HA:CD44 *Signaling* die Dermatoportun-Synthese inhibiert und damit als Regulationsmechanismus fungiert, um einer vorzeitigen Entwicklung der Matrifibrozyten entgegenzuwirken. Eine Reduktion von HA in den *Hmmr*-OE Mäusen, vielleicht sogar in Kombination mit einer reduzierten Expression von CD44, würde diese „Bremse“ der Dermatoportun-Synthese aufheben. Möglich wäre aber auch ein weitgehend HA:CD44 unabhängiger Mechanismus der Regulation von Dermatoportun. In diesem Fall wäre ein kompensatorischer Mechanismus denkbar, in dem Sinne, dass der relative Mangel an HA in der Matrix durch die *Hmmr*-OE induzierte erhöhte Synthese eines anderen Matrixbestandteils, des Dermatoportins, ausgeglichen wird. Dadurch würde die Integrität und Funktionalität der EZM aufrechterhalten. Insgesamt bleibt jedoch festzuhalten, dass trotz mehrerer Studien zu HA und Dermatoportun, zum Beispiel im Kontext der dermalen Wundheilung²²⁸ die Aufklärung des genauen Mechanismus der HA-vermittelten Expression von Dermatoportun noch weitgehend ungeklärt ist und weiterer Forschung bedarf.

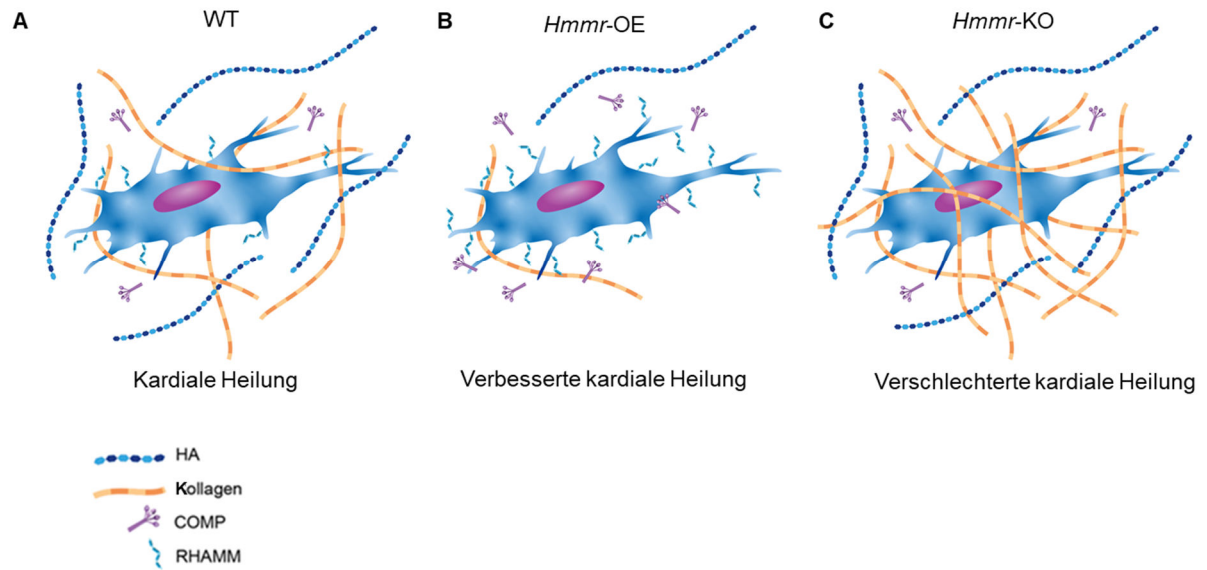


Abbildung 47: Schematische Zusammenfassung der veränderten EZM-Komponenten 1 Woche nach I/R. **A**, Darstellung der wildtypischen Geschwistertiere, die eine normale Expression von RHAMM, Kollagen, Hyaluronsäure und COMP aufweisen. Unter physiologischen Bedingungen findet in diesen Tieren eine unveränderte kardiale Heilung statt. **B**, Darstellung der Auswirkungen einer globalen Überexpression von RHAMM nach einem Myokardinfarkt. Aufgezeigt ist hier eine verminderte Bildung von Kollagenfibrillen wie auch von Hyaluronsäure und eine erhöhte Expression von COMP. Die relativ starke Überexpression von RHAMM resultiert in einem protektiven Phänotyp mit verbesserter kardiale Heilung nach I/R. **C**, Darstellung der Auswirkungen eines globalen Knockouts von RHAMM nach einem Myokardinfarkt. Es sind keine Unterschiede in der Menge von COMP und HA nachzuweisen, jedoch produzieren diese Tiere vermehrt Kollagenfibrillen. Der *Knockout* von RHAMM resultiert in einem detrimental Phänotyp mit verschlechterter kardiale Heilung nach I/R.

5 Zusammenfassung

Aktuell und auch in Zukunft werden Herz-Kreislauf-Erkrankungen und deren Folgen die häufigste Todesursache in Deutschland darstellen. Im Zuge eines Myokardinfarktes kommt es zu einem Absterben von Kardiomyozyten und nachfolgend zu einer aseptischen Entzündung und zu strukturellen Veränderungen der EZM und des Myokards (*Remodeling*). Trotz intensiver Forschung ist eine spezifische pharmakologische Beeinflussung der EZM noch nicht möglich. Bereits seit vielen Jahren beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe mit der Erforschung der kardialen EZM, insbesondere der HA. Es konnte bereits 2019 gezeigt werden, dass HAS2 für die Herzheilung nach AMI entscheidend ist, indem es die Aktivierung der Herzfibroblasten und das Überleben der Makrophagen fördert¹⁷⁷. Auch für Has3 konnte in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass diese für eine physiologische T-Zell-Antwort nach I/R notwendig ist¹⁷⁸. Nachdem Missinato *et al.* 2015 RHAMM – einen wichtigen HA-Rezeptor – als entscheidenden Faktor für die Herzregeneration in Zebrafischen identifizierten, weckte dies unser Interesse. So konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass die mRNA-Expression von RHAMM (*Hmmr*) bereits 48 Stunden nach I/R stark erhöht ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von RHAMM auf den Infarktphänotyp und die Heilung nach I/R in einem Mausmodell untersucht. Dazu wurden sowohl Tiere mit einer globalen Überexpression als auch mit einem globalen *Knockout* verwandt. Die Induktion der Ischämie erfolgte dabei bei geschlossenem Thorax, um ein Infarktmodell möglichst ähnlich dem eines Menschen zu verwenden. Im Anschluss wurden Herzen dieser Mäuse sowohl echokardiografisch, histologisch als auch durchflusszytometrisch zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht.

Wir konnten mit dieser Studie die positiven Effekte einer RHAMM Überexpression nach I/R nachweisen. So ermittelten wir in den *Hmmr*-OE Mäusen eine kleinere Narbe mit insgesamt weniger Kollagen 3 Wochen nach Infarkt, sowie signifikant mehr COMP und weniger HA 1 Woche nach I/R und mehr Dermatoportun 3 Wochen nach I/R. Für die *Hmmr*-KO Mäuse konnten wir eine vergrößerte Narbe, insgesamt mehr Kollagen und eine verschlechterte Herzfunktion nachweisen. Es lässt sich daher festhalten, dass RHAMM eine entscheidende Rolle für das kardiale *Remodeling* nach I/R spielt und essenziell für die Heilung und das physiologische *Remodeling* ist. Die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen sowie die Beantwortung der Frage, ob RHAMM in Zukunft pharmakotherapeutisch adressierbar sein könnte, bedarf weiterer Forschungsarbeiten.

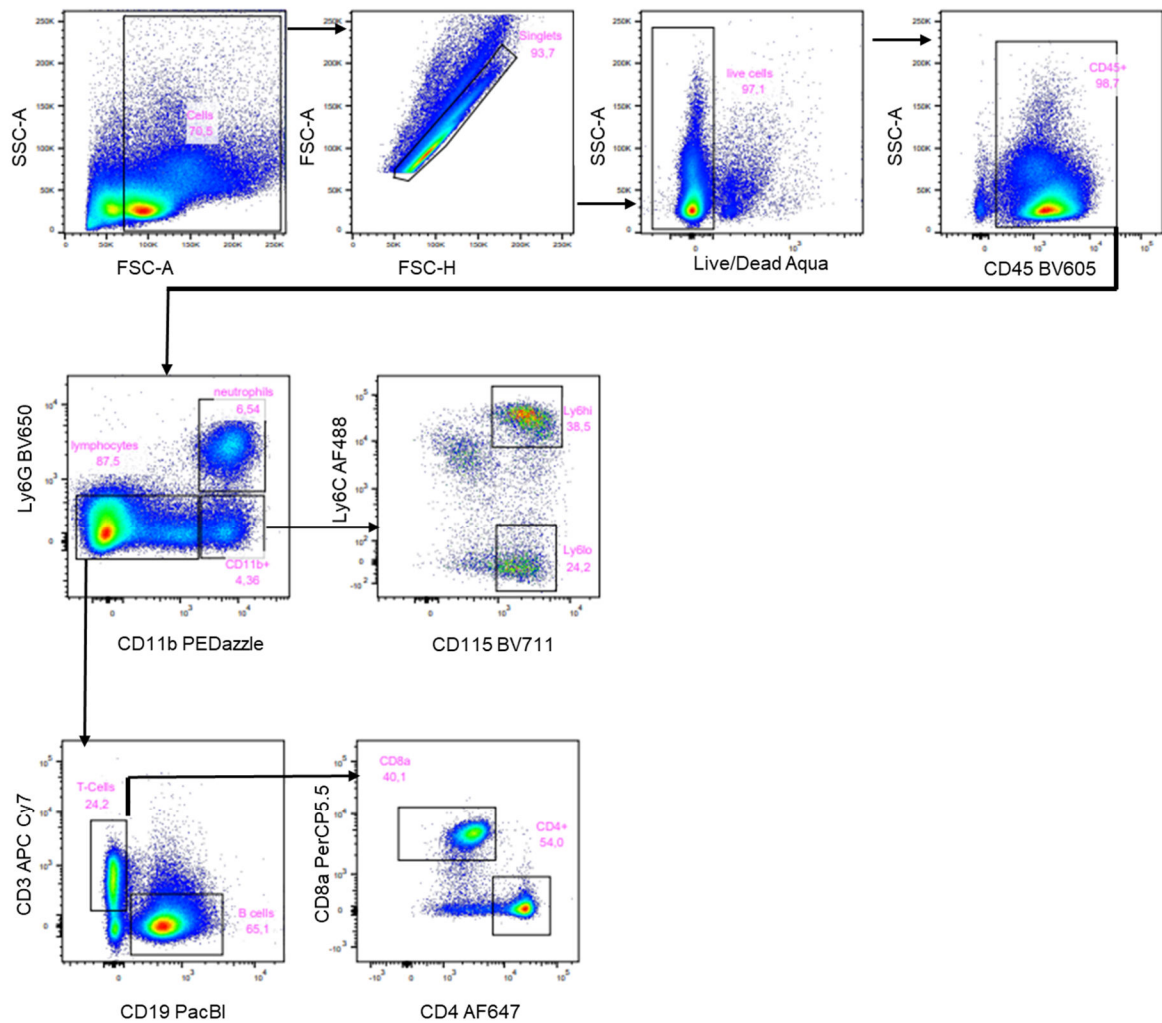
6 Summary

Cardiovascular diseases are projected to remain the leading cause of death in Germany both now and in the future. In response to myocardial infarction, the extracellular matrix (ECM) and the myocardium undergo extensive remodeling. Despite intensive research, we have yet to develop pharmacological interventions that can effectively modify ECM-remodeling and function. Our research group has long focused on the cardiac ECM, with particular attention to hyaluronic acid (HA). In 2019, we demonstrated the critical role of HAS2 in cardiac healing, highlighting its role in activating cardiac fibroblasts and supporting macrophage survival. Furthermore, our studies revealed that Has3 contributes to cardiac healing after ischemia/reperfusion (I/R) through promoting a physiological T-cell response. The discovery of RHAMM, a key HA receptor, as an important factor for heart regeneration in zebrafish by Missinato *et al.* in 2015 intrigued us. We subsequently found that RHAMM mRNA expression (*Hmnr*) increases significantly within 48 hours following I/R.

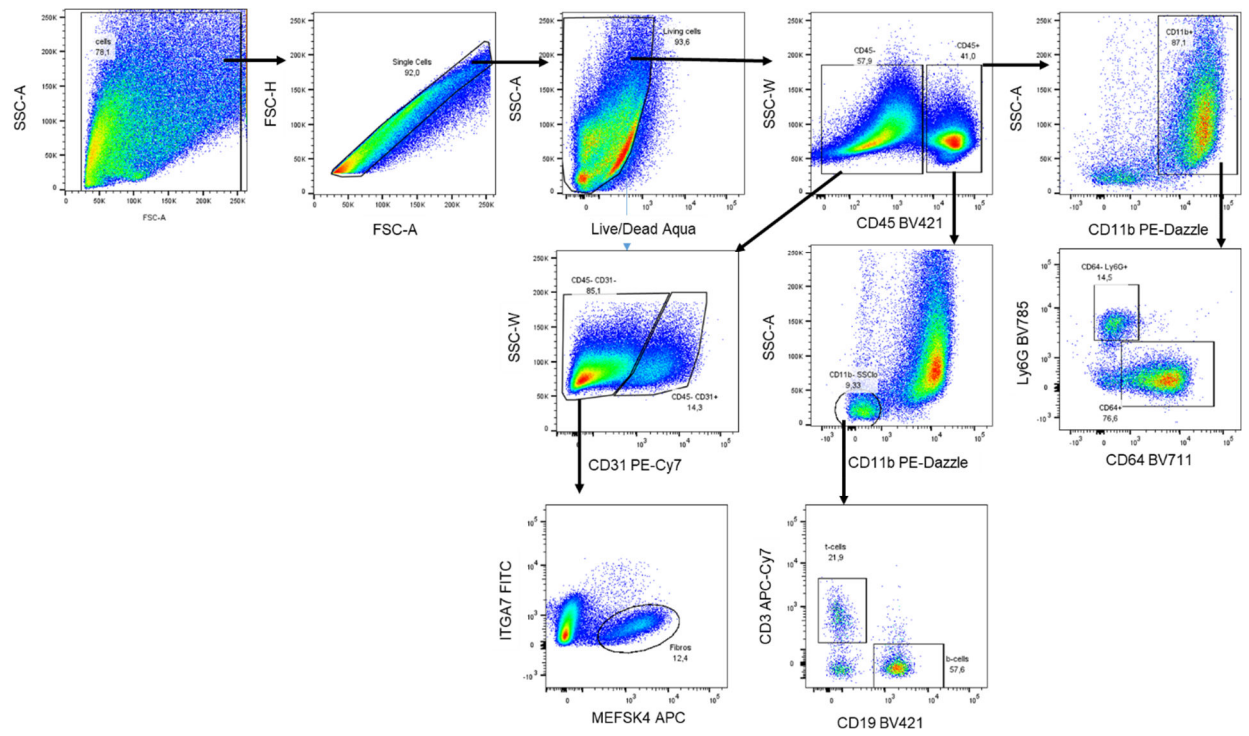
In this study, we explored RHAMM's role in cardiac healing after I/R in a mouse model. We employed both global RHAMM-overexpression and -knockout mice, inducing ischemia with the thorax closed to closely mimic human infarction. The hearts of these mice were then examined using echocardiography, histology, and flow cytometry at various time points.

Our results suggest a protective effect of RHAMM overexpression following I/R. In *Hmnr*-overexpression mice, we observed smaller infarct scars with reduced collagen content three weeks post-infarction, increased COMP, and decreased HA one week after I/R, as well as higher levels of dermatopontin three weeks after I/R. In contrast, *Hmnr*-knock out mice exhibited larger scars, greater collagen accumulation, and impaired cardiac function. These findings highlight RHAMM's pivotal role in cardiac remodeling and its essential contribution to effective healing post-I/R. Further research is needed to elucidate the precise mechanisms by which these parameters interact and to explore the potential for pharmacological targeting of RHAMM in the future.

7 Appendix



Appendix 1: *Gating* Schema Blut, Milz und Knochenmark



Appendix 2: *Gating* Schema Herz.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahre 2023 (modifiziert nach ²⁾)	1
Abbildung 2: Die häufigsten kardiovaskulären Todesursachen in Deutschland im Jahre 2023 (modifiziert nach ⁴⁾)	2
Abbildung 3: Veränderte Gene des Fibro-1 Clusters der Einzelzellanalyse 3 und 7 Tage nach I/R gepoolt.	9
Abbildung 4: Ableitung von Trajektorien, Pseudozeitordnung und differenzielle Progressionsanalyse von WT- und RHAMM-OE-Herzfibroblasten	10
Abbildung 5: Molekularstruktur der Hyaluronsäure (modifiziert nach ⁷⁷⁾)	11
Abbildung 6: Darstellung der Generierung von globalen Hmnr-OE und Hmnr-KO Mäusen	22
Abbildung 7: Darstellung der Myokardialen Ischämie untere Abbindung der left anterior descending artery (LAD)	24
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Versuche und deren Zeitpunkte	25
Abbildung 9: Aufnahme der Validierung mittels Western Blot	40
Abbildung 10: Bestimmung der Herzfunktion von Hmnr-OE Tieren mittels EKG	41
Abbildung 11: Bestimmung der Herzfunktion von Hmnr-KO Tieren mittels EKG	42
Abbildung 12: Infarktgrößen Bestimmung mittels TTC-Färbung von WT- und Hmnr-OE Mäusen 24 Stunden nach I/R	43
Abbildung 13: Infarktgrößen Bestimmung mittels TTC-Färbung von WT- und Hmnr-KO Mäusen 24 Stunden nach I/R	43
Abbildung 14: Eine globale Überexpression von RHAMM (Hmnr) führt zu einer verringerten Narbengröße 3 Wochen nach kardialer Ischämie/Reperfusion (I/R)	44
Abbildung 15: Ein globaler Knockout von RHAMM (Hmnr) führt zu einer vergrößerten Narbe 3 Wochen nach kardialer Ischämie/Reperfusion (I/R)	44
Abbildung 16: Bestimmung der Narbengröße mittels Picro-Siriusrot Färbung der Hmnr-OE Mäuse	46
Abbildung 17: Packungsdichte der Kollagenfasern in Hmnr-OE Mäusen	47
Abbildung 18: Ermittlung des Kollagengehaltes in Hmnr-OE Mäusen	48
Abbildung 19: Bestimmung der Narbengröße mittels Picro-Siriusrot Färbung der Hmnr-KO Mäuse	49
Abbildung 20: Packungsdichte der Kollagenfasern in Hmnr-KO Mäusen	50
Abbildung 21: Ermittlung des Kollagengehaltes in Hmnr-KO Mäusen	51

Abbildung 22: Durchführung der passiven Kraftmessung nach I/R	52
Abbildung 23: Immunhistochemische Bestimmung des Kollagen 5A1 - Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 1 Woche nach I/R	53
Abbildung 24: Immunhistochemische Bestimmung des Kollagen 5A1 - Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R	54
Abbildung 25: Immunhistochemische Bestimmung des Kollagen 6A1 – Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 1 Woche nach I/R	55
Abbildung 26: Immunhistochemische Bestimmung des Kollagen 6A1 - Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R	56
Abbildung 27: Immunhistochemische Bestimmung von Makrophagen im Herzgewebe in Hmnr-OE Mäusen 1 Woche nach I/R	57
Abbildung 28: Immunhistochemische Bestimmung des Decorin – Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 1 Woche nach I/R	58
Abbildung 29: Immunhistochemische Bestimmung des Decorin - Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R	59
Abbildung 30: Immunhistochemische Bestimmung des Dermato pontin – Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 1 Woche nach I/R	60
Abbildung 31: Immunhistochemische Bestimmung des Dermato pontin – Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R	61
Abbildung 32: Immunhistochemische Bestimmung des CCN2 - Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 1 Woche nach I/R	62
Abbildung 33: Immunhistochemische Bestimmung des CCN2 - Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R	63
Abbildung 34: Immunhistochemische Bestimmung des CCN5 - Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 1 Woche nach I/R	64
Abbildung 35: Immunhistochemische Bestimmung des CCN5 - Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R	65
Abbildung 36: Immunhistochemische Bestimmung des COMP - Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 1 Woche nach I/R	66
Abbildung 37: Immunhistochemische Bestimmung des COMP – Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 3 Wochen nach I/R	67
Abbildung 38: Immunhistochemische Bestimmung des COMP – Gehaltes in Hmnr-KO Mäusen 1 Woche nach I/R68	
Abbildung 39: Immunhistochemische Bestimmung des COMP – Gehaltes in Hmnr-KO Mäusen 3 Wochen nach I/R	69
Abbildung 40: Immunhistochemische Bestimmung des HA - Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 72h nach I/R	70

Abbildung 41: Immunhistochemische Bestimmung des HA - Gehaltes in Hmnr-OE Mäusen 1 Woche nach (I/R)	71
Abbildung 42: Immunhistochemische Bestimmung des HA – Gehaltes in Hmnr-KO Mäusen 1 Woche nach I/R	72
Abbildung 43: Immunhistochemische Bestimmung des HA – Gehaltes in Hmnr-KO Mäusen 3 Woche nach I/R	73
Abbildung 44: Durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellen der Milz 72 Stunden nach Infarkt für die Hmnr-OE Mäuse	74
Abbildung 45: Durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellen des Herzens 72 Stunden nach Infarkt für die Hmnr-OE Mäuse.....	75
Abbildung 46: Durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellen des Knochenmarks 72 Stunden nach Infarkt für die Hmnr-OE Mäuse.....	76
Abbildung 47: Schematische Zusammenfassung der veränderten EZM-Komponenten 1 Woche nach I/R	86

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien Western-Blot etc. (Puffer, Antikörper, Verbrauchsmaterialien)	28
Tabelle 2: Antikörper für durchflusszytometrische Untersuchungen	30
Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie	30
Tabelle 4: Verwendete Lösungen und Puffer für histologische Färbungen	34
Tabelle 5: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistochemie	35

10 Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methyumbelliferon
aa	Nicht-saure Aminosäuren
AAR	<i>Area at risk</i>
ab	<i>Antibody</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Alexa Fluor
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ANXA-1	Annexin A1
APC	Allophycocyanin
APC/Cy7	Allophycocyanin-Cyanin7 Tandem-Konjugat
ATP	Adenosintriphosphat
AURKA	Aurora Kinase-A
ANXA1	Annexin1
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	<i>CC chemokine ligand</i>
CCR	<i>CC chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEMIP	<i>Cell migration-inducing protein</i>
CF	neonatale Rattenherzfibroblasten
cM	Centimorgan
CM	neonatalen Rattenkardiomyozyten
COL	Kollagen
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
<i>Cthrc1</i>	<i>Collagen triple helix repeat containing 1</i>
CXCR1	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1
Da	Dalton
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DCN	Decorin

DEG	Differentiell exprimierte Gene
DMT-2	Diabetes mellitus Typ-2
DNA	<i>Desoxyribunucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbeccos Phosphate buffered saline</i>
DPT	Dermatopontin
DTT	Dithioretinol
ECL	Elektrochemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethenyylenglycolbis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
ESV	Endsystolisches Volumen
<i>et al.</i>	und andere
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisoithiocyanat
FL	<i>Full length</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Gramm
G	<i>Gravity</i>
GAG	Glykosaminoglycan
GlcA	Glucuronsäure
GlcNAC	N-Acetylglukosamin
GLS	Globale longitudinale Dehnung, <i>globale longitudinale strain</i>
GOBP	<i>Gene Ontology Biological Processes</i>
<i>Gsn</i>	<i>Gelsolin</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	<i>hour</i>

H ₂ O	Wasser
HA	Hyaluronsäure
HAbP	Hyaluronsäure-Bindeprotein
HARE	Hyaluronan receptor for endocytosis
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HF	Herzfrequenz
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
<i>Hmmr</i>	<i>Hyaluronan-mediated motility receptor</i>
HMW	<i>High molecular weight</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HYAL	Hyaluronidase
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IL	Interleukin
INF	Interferon
I/R	Ischämie und Reperfusion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	<i>Knockout</i>
LAD	<i>Left anterior descending</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
loxP	Locus of X-over P1
LV	Linker Ventrikel
LYVE1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor</i>
Ly6	<i>Lymphocyte antigen 6 complex</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1 (CCL-2)</i>
MertK	<i>Myeloid-epithelial-reproductive receptor tyrosine kinase</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MI	Myokardinfarkt
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mN	Millinewton
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid, reduzierte Form
NaF	Natriumfluorid
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm	Nanometer
OE	<i>Overexpression</i>
OP	Operation
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCOS	Polyzystisches Ovar-Syndrom
PCI	Perkutane Koronarintervention
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGFR	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
PE	Phycoerythrin
PE/Cy7	Phycoerythrin-Cyanin7 Tandem-Konjugat
PerCP/Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-protein Cyanin5.5 Tandem Konjugat
PFA	Paraformaldehyd
Postn	Periostin
PVDF	Polyvinyliden Difluorid
RES	Reticuloendotheliales System
RHAMM	<i>Receptor for hyaluronan-mediated motility</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
sc-RNA-seq	<i>single cell RNA sequencing</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat

SMAD-7	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 7</i>
SPACR	<i>Sialoprotein associated with cones and rods</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
Tcf	<i>Transkription factor</i>
<i>tdTomato</i>	<i>Tandem dimer Tomato</i>
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor-β1</i>
TGF β R1	<i>Transforming growth factor-β1 Receptor</i>
Th	T-Helferzellen
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zellen
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
U	<i>Unit</i>
u.a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
V	Volumen
VCAM	<i>Vascular adhesion molecule</i>
WH	<i>whole heart</i>
WISP	<i>WNT1-inducible-signaling pathway protein 1</i>
WT	Wildtyp
α -SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

11 Literaturverzeichnis

- 1 *Todesursachenstatistik*, <<https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Methoden/todesursachenstatistik.html>> (2022).
- 2 *Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10 und nach Geschlecht für 2022*, <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html> (2022).
- 3 WJ., R. Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. *Cardiovasc Drugs Ther.*, doi:10.1023/a:1027351808326.
- 4 *Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen*, <<https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>> (2022).
- 5 Schlenger, R. PCOS – weit mehr als eine Zyklusstörung. <<https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2024/05/23/pcos-weit-mehr-als-eine-zyklusstoerung>>.
- 6 Berry JD, D. A., Cai X, Garside DB, Ning H, Thomas A, Greenland P, Van Horn L, Tracy RP, Lloyd-Jones DM. Lifetime Risks of Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* , 366(364):321-369, doi:10.1056/NEJMoa1012848 (2012 Jan 26).
- 7 Lloyd-Jones DM, L. E., Larson MG, D'Agostino RB, Beiser A, Wilson PW, Wolf PA, Levy D. . Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age. . *Circulation*, 14;113(116):791-118, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.548206. Epub 2006 Feb 6. (2006 Feb).
- 8 M.D., W. B. K. New perspectives on cardiovascular risk factors. *American Heart Journal* **114**, 213-219 (1987).
- 9 Moran AE, F. M., Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, Flaxman A, Murray CJ, Naghavi M. . The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation*, 129(114):1493-1501, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004046. Epub 2014 Feb 26. (2014).
- 10 Kumar M, K. E., Bodduluru LN, Dahiya V, Sharma D, Kumar V, Lahkar M. Animal models of myocardial infarction: Mainstay in clinical translation. *Regul Toxicol Pharmacol.* **76**, doi:10.1016/j.yrtph.2016.03.005. Epub 2016 Mar 14 (2016).
- 11 Hugo A. Katus (Heidelberg), C. W. H. G., Ralf Zahn (Ludwigshafen am Rhein). Pocket-Leitlinie: Vierte Definition des Myokardinfarktes (Version 2018). *European Heart Journal* (2019).
- 12 Weber C, N. H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.*, doi:10.1038/nm.2538.
- 13 Frampton J, O. A., Zeitler EP. Arrhythmias After Acute Myocardial Infarction. *Yale J Biol Med.* **96**, 83-94, doi:10.59249/LSWK8578 (2023).
- 14 Tanaka H, A. S., Yamashita T, Arima S, Saigo M, Nakao S, Toda H, Nomoto K, Tahara M. Serum levels of cardiac troponin I and troponin T in estimating myocardial infarct size soon after reperfusion. . *Coron Artery Dis.*, doi:10.1097/00019501-199707000-00005.
- 15 Ricchiuti V, S. S., Murakami MM, Voss EM, Apple FS. Cardiac troponin I and T alterations in dog hearts with myocardial infarction: correlation with infarct size. *Am J Clin Pathol.*, doi:10.1093/ajcp/110.2.241.
- 16 Mohammad MA, K. S., Smith JG, Noc M, Lang I, Holzer M, Clemmensen P, Jensen U, Engstrøm T, Arheden H, James S, Lindahl B, Metzler B, Erlinge D. Predictive Value of High-Sensitivity Troponin T for Systolic Dysfunction and Infarct Size (Six Months) After ST-Elevation Myocardial Infarction. *Am J Cardiol.*, doi:10.1016/j.amjcard.2018.05.005.
- 17 Adams, J. E., 3rd, Bodor, G.S., Davila-Roman, V.G., Delmez, J.A., Apple, F.S., & Ladenson, J. H., and Jaffe, A.S. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* **88**, 101–106 (1993).

- 18 Hamm CW, K. H. New biochemical markers for myocardial cell injury. . *Curr Opin Cardiol.* **10(4)**:, 355-360, doi:10.1097/00001573-199507000-00003.
- 19 Thygesen K, A. J., Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD; Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. . Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol.* **72(18)**, 2231-2264, doi:10.1016/j.jacc.2018.08.1038.
- 20 Thygesen K, A. J., Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; Writing Group on the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction; Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Katus HA, Apple FS, Lindahl B, Morrow DA, Chaitman BA, Clemmensen PM, Johanson P, Hod H, Underwood R, Bax JJ, Bonow RO, Pinto F, Gibbons RJ, Fox KA, Atar D, Newby LK, Galvani M, Hamm CW, Uretsky BF, Steg PG, Wijns W, Bassand JP, Menasché P, Ravkilde J, Ohman EM, Antman EM, Wallentin LC, Armstrong PW, Simoons ML, Januzzi JL, Nieminen MS, Gheorghiade M, Filippatos G, Luepker RV, Fortmann SP, Rosamond WD, Levy D, Wood D, Smith SC, Hu D, Lopez-Sendon JL, Robertson RM, Weaver D, Tendera M, Bove AA, Parkhomenko AN, Vasilieva EJ, Mendis S; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* **33(20)**, 2551-2567, doi:10.1093/eurheartj/ehs184.
- 21 et.al., G. G. v. W. *Myokardinfarkt*, <<https://flexikon.doccheck.com/de/Myokardinfarkt>> (2022).
- 22 Ibanez B, J. S., Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimský P; ESC Scientific Document Group. . 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). . *Eur Heart J.* **39(2)**, doi:10.1093/eurheartj/ehx393.
- 23 Jennings RB, M. C., Steenbergen C Jr, Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation.* **82(3 Suppl)**, I12-12.
- 24 Goodwin GW, T. H. Improved energy homeostasis of the heart in the metabolic state of exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, 1490-1501, doi:10.1152/ajpheart.2000.279.4.H1490 (2000).
- 25 Hendrickson SC, S. L. J., Lowe JE, Abdel-aleem S. Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem.* **166**, 85-94 (1997).
- 26 Prabhu SD, F. N. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res.* **119(1)**, 91-112, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303577.
- 27 Foell, D., Witkowski, H., Vogl, T., and Roth, J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol.* **81**, 28-37 (2007).
- 28 de Haan JJ, S. M., Pasterkamp G, Arslan F. . Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. . *Mediators Inflamm.*, doi:10.1155/2013/206039 (2013).
- 29 Chandrasekar B, S. J., Freeman GL. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. . *Circulation.* **103(18)**, 2296-2302, doi:10.1161/01.cir.103.18.2296.
- 30 Scarabelli T, S. A., Rayment N, Pasini E, Comini L, Curello S, Ferrari R, Knight R, Latchman D. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury. . *Circulation* **104(3)**, 253-256, doi:10.1161/01.cir.104.3.253.
- 31 NG., F. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. . *J Clin Invest.* **127(5)**, 1600-1612, doi:10.1172/JCI87491.

- 32 Koyama T, S. M., Baba A, Kosugi R, Akaishi M. Effects of early reperfusion on creatine kinase release in patients with acute myocardial infarction: implications for reperfusion injury. . *Int J Cardiol.* **155(2)**, 335-337, doi:10.1016/j.ijcard.2011.12.049.
- 33 Sharma V, B. R., Yellon DM. . Targeting reperfusion injury in acute myocardial infarction: a review of reperfusion injury pharmacotherapy. . *Expert Opin Pharmacother.* **13(8)**, 1153-1175, doi:10.1517/14656566.2012.685163.
- 34 Epelman S, L. P., Mann DL. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol.* **15(2)**, 117-129, doi:10.1038/nri3800.
- 35 Nian M, L. P., Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res.* **94(12)**, 1543-1553, doi:10.1161/01.RES.0000130526.20854.fa.
- 36 HEMATOLOGY, A. S. O. *Blood Basics*,
<<https://www.hematology.org/education/patients/blood-basics>> (
- 37 Sellak H, F. E., Hakim J, Pasquier C. . Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. . *Blood.* **83(9)**, 2669-2677.
- 38 Shingu M, N. S., Nishimukai H, Nobunaga M, Kitamura H, Tomo-Oka K. . Activation of complement in normal serum by hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-related oxygen radicals produced by activated neutrophils. *Clin Exp Immunol.* **90(1)**, 72-78, doi:10.1111/j.1365-2249.1992.tb05834.x.
- 39 Dutta P, N. M. Monocytes in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **35(5)**, 1066-1070, doi:10.1161/ATVBAHA.114.304652.
- 40 Abram CL, L. C. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol.* **27**, 339-362, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132554 (2009).
- 41 RP., M. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res.*, 331-339, doi:10.1093/cvr/cvv154.
- 42 Epelman S, L. P., Mann DL. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. . *Nat Rev Immunol.* **15(2)**, 117-129, doi:doi:10.1038/nri3800.
- 43 Sager HB, H. T., Hulsmans M, Dutta P, Courties G, Sebas M, Wojtkiewicz GR, Tricot B, Iwamoto Y, Sun Y, Weissleder R, Libby P, Swirski FK, Nahrendorf M. Targeting Interleukin-1 β Reduces Leukocyte Production After Acute Myocardial Infarction. *Circulation.* **132(20)**, 1880-1890, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016160.
- 44 Sager HB, H. M., Lavine KJ, Moreira MB, Heidt T, Courties G, Sun Y, Iwamoto Y, Tricot B, Khan OF, Dahlman JE, Borodovsky A, Fitzgerald K, Anderson DG, Weissleder R, Libby P, Swirski FK, Nahrendorf M. Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circ Res.* **119(7)**, 853-864, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309001.
- 45 Geissmann F, J. S., Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* **19(1)**, 71-82, doi:10.1016/s1074-7613(03)00174-2.
- 46 Nahrendorf M, S. F., Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. . The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* **204(12)**, 3037-3047, doi:10.1084/jem.20070885.
- 47 Epelman S, L. K., Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. . *Immunity.* **41(1)**, 21-35, doi:10.1016/j.immuni.2014.06.013.
- 48 Bajpai, G. *et al.* Tissue Resident CCR2- and CCR2+ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. *Circ Res* **124**, 263-278, doi:10.1161/circresaha.118.314028 (2019).
- 49 Hofmann U, F. S. Role of lymphocytes in myocardial injury, healing, and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res.* **116(2)**, 354-367, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304072.
- 50 Zouggari Y, A.-O. H., Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guérin C, Vilar J, Caligiuri G, Tsiantoulas D, Laurans L, Dumeau E, Kotti S, Bruneval P, Charo IF, Binder CJ, Danchin N, Tedgui A, Tedder TF, Silvestre JS, Mallat Z. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med.* **19(10)**, 1273-1280, doi:10.1038/nm.3284.

- 51 Hofmann U, F. S. Role of lymphocytes in myocardial injury, healing, and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res*. **116**(2), 354-367, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304072.
- 52 Liuzzo G, T. F., Pedicino D. Interleukin-17 in atherosclerosis and cardiovascular disease: the good, the bad, and the unknown. *Eur Heart J*. **34**(8), 556-559, doi:10.1093/eurheartj/ehs399.
- 53 Yu, W. *et al.* Advances in T Cells Based on Inflammation in Metabolic Diseases. *Cells* **11**, doi:10.3390/cells11223554 (2022).
- 54 Weirather, J. *et al.* Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ Res* **115**, 55-67, doi:10.1161/circresaha.115.303895 (2014).
- 55 Nahrendorf, M. & Swirski, F. K. Regulating repair: regulatory T cells in myocardial infarction. *Circ Res* **115**, 7-9, doi:10.1161/circresaha.114.304295 (2014).
- 56 Fu X, K. H., Kanisicak O, Boyer JG, Vagnozzi RJ, Maliken BD, Sargent MA, Prasad V, Valiente-Alandi I, Blaxall BC, Molkentin JD. . Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *J Clin Invest*. **128**(5), 2127-2143, doi:10.1172/JCI98215.
- 57 Woodall MC, W. B., Gao E, Yuan A, Koch WJ. Cardiac Fibroblast GRK2 Deletion Enhances Contractility and Remodeling Following Ischemia/Reperfusion Injury. . *Circ Res*. **119**(10), 1116-1127, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309538.
- 58 Ma Y, I. R., Jung M, Czubyrt MP, Lindsey ML. Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps. *Trends Pharmacol Sci* **38**(5), 448-458, doi:10.1016/j.tips.2017.03.001.
- 59 Clark DA, C. R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol*. **30**(3), 293-298, doi:10.1016/s1357-2725(97)00128-3.
- 60 Dobaczewski M, B. M., Li N, Gonzalez-Quesada C, Mendoza LH, Wang XF, Frangogiannis NG. Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction. *Circ Res*. **107**(3), 418-428, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.216101.
- 61 Ruiz-Villalba A, R. J., Hernández SC, Vilas-Zornoza A, Fortelny N, Castro-Labrador L, San Martin-Uriz P, Lorenzo-Vivas E, García-Olloqui P, Palacio M, Gavira JJ, Bastarrika G, Janssens S, Wu M, Iglesias E, Abizanda G, de Morentin XM, Lasaga M, Planell N, Bock C, Alignani D, Medal G, Prudovsky I, Jin YR, Ryzhov S, Yin H, Pelacho B, Gomez-Cabrero D, Lindner V, Lara-Astiaso D, Prósper F. Single-Cell RNA Sequencing Analysis Reveals a Crucial Role for CTHRC1 (Collagen Triple Helix Repeat Containing 1) Cardiac Fibroblasts After Myocardial Infarction. *Circulation*. **142**(19), 1831-1847, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044557.
- 62 Del Monte-Nieto G, F. J., Gorski DJ, Harvey RP, Kovacic JC. Basic Biology of Extracellular Matrix in the Cardiovascular System, Part 1/4: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol*. **75**(17), 2169-2188, doi:10.1016/j.jacc.2020.03.024.
- 63 Torimoto K, E. K., Nakayama Y, Yanagisawa H, Eguchi S. Cardiac and perivascular myofibroblasts, matrifibrocytes, and immune fibrocytes in hypertension; commonalities and differences with other cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. **120**, 567-580, doi:10.1093/cvr/cvae044 (2024).
- 64 Hascall VC, W. A., Tammi M, Oikari S, Tammi R, Passi A, Vigetti D, Hanson RW, Hart GW. . The dynamic metabolism of hyaluronan regulates the cytosolic concentration of UDP-GlcNAc. *Matrix Biol*. **35**, 14-17, doi:10.1016/j.matbio.2014.01.014.
- 65 Weigel PH, H. V., Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*. **272**(22), 13997-14000, doi:10.1074/jbc.272.22.13997.
- 66 Kiene LS, H. S., Suvorava T, Rabausch B, Müller J, Kojda G, Kretschmer I, Twarock S, Dai G, Deenen R, Hartwig S, Lehr S, Köhrer K, Savani RC, Grandoch M, Fischer JW. Deletion of Hyaluronan Synthase 3 Inhibits Neointimal Hyperplasia in Mice. . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **36**, e9-16, doi:10.1161/ATVBAHA.115.306607 (2016).
- 67 Hunger J, B. A., Bakker HJ, Bonn M, Richter RP. Hydration dynamics of hyaluronan and dextran. *Biophys J*. **103**(1), L10-12, doi:10.1016/j.bpj.2012.05.028.

- 68 EV., M. Hyaluronan: More than just a wrinkle filler. *Glycobiology*. **26(6)**, 553-559, doi:10.1093/glycob/cww033.
- 69 Fraser JR, L. T., Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. **242(1)**, 27-33, doi:10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x.
- 70 Termeer C, S. J., Simon JC. Hyaluronan--magic glue for the regulation of the immune response? *Trends Immunol*. **24(3)**, 112-114, doi:10.1016/s1471-4906(03)00029-2.
- 71 Camenisch TD, S. A., Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A Jr, Kubalak S, Klewer SE, McDonald JA. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest*. **106(3)**, 349-360, doi:10.1172/JCI10272.
- 72 Weigel PH, D. P. Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases. *J Biol Chem*. **282(51)**, 36777-36781, doi:10.1074/jbc.R700036200.
- 73 Hinneh JA, G. J., Moore NL, Butler LM, Centenera MM. The role of RHAMM in cancer: Exposing novel therapeutic vulnerabilities. *Front Oncol*. **12**, doi:10.3389/fonc.2022.982231 (2022).
- 74 Tolg C, M. B., McCarthy JB, Nelson AC, Turley EA. Hyaluronan Functions in Wound Repair That Are Captured to Fuel Breast Cancer Progression. . *Biomolecules*. **11(11):1551**, doi:10.3390/biom11111551 (2021).
- 75 Liu M, T. C., Turley E. Dissecting the Dual Nature of Hyaluronan in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. **10:947**, doi:10.3389/fimmu.2019.00947 (2019).
- 76 Dong Y, A. A., Olsson M, Cali V, Hardman B, Dosanjh M, Lauer M, Midura RJ, Hascall VC, Brown KL, Johnson P. Endotoxin free hyaluronan and hyaluronan fragments do not stimulate TNF- α , interleukin-12 or upregulate co-stimulatory molecules in dendritic cells or macrophages. *Sci Rep.*, doi:10.1038/srep36928 (2016).
- 77 Varki A, C. R., Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH. *Essentials of Glycobiology*. 3 edn, 197-206 (2015-2017).
- 78 Hascall V, E. J. I. r., Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, , Hart GW, A. M., Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, & Seeberger PH, e. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY). 197-206 (2015).
- 79 Caon, I. *et al.* Cell Energy Metabolism and Hyaluronan Synthesis. *J Histochem Cytochem* **69**, 35-47, doi:10.1369/0022155420929772 (2021).
- 80 Itano N, K. K. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life*. **54(4)**, 195-199, doi:10.1080/15216540214929.
- 81 Spicer AP, S. M., Olsen AS, Brown N, Wells DE, Doggett NA, Itano N, Kimata K, Inazawa J, McDonald JA. . Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes. *Genomics*. **41(3)**, 493-497, doi:10.1006/geno.1997.4696.
- 82 Itano N, S. T., Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem*. **274(35)**, 25085-25092, doi:10.1074/jbc.274.35.25085.
- 83 Homann S, G. M., Kiene LS, Podsvyadek Y, Feldmann K, Rabausch B, Nagy N, Lehr S, Kretschmer I, Oberhuber A, Bollyky P, Fischer JW. Hyaluronan synthase 3 promotes plaque inflammation and atheroprogession. *Matrix Biol*. **66**, 67-80, doi:10.1016/j.matbio.2017.09.005.
- 84 Kuipers HF, N. N., Ruppert SM, Sunkari VG, Marshall PL, Gebe JA, Ishak HD, Keswani SG, Bollyky J, Frymoyer AR, Wight TN, Steinman L, Bollyky PL. The pharmacokinetics and dosing of oral 4-methylumbelliferone for inhibition of hyaluronan synthesis in mice. . *Clin Exp Immunol*. **185(3)**, 372-381, doi:10.1111/cei.12815.
- 85 Nagy N, F. T., Melchior-Becker A, Röck K, Ter Braak M, Jastrow H, Kinzig M, Lucke S, Suvorava T, Kojda G, Weber AA, Sörgel F, Levkau B, Ergün S, Fischer JW. Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis. . *Circulation*. **122(22)**, 2313-2322, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.972653.

- 86 Jaskuła K, S. M., Gaciong Z, Skiba DS. Cardiovascular Effects Mediated by HMMR and CD44. *Mediators Inflamm.*, doi:10.1155/2021/4977209.
- 87 Entwistle J, H. C., Turley EA. HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton. *J Cell Biochem.* **61(4)**, 569-577, doi:10.1002/(sici)1097-4644(19960616)61:4<569::aid-jcb10>3.0.co;2-b.
- 88 Senbanjo LT, C. M. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol.* **5**, 18, doi:10.3389/fcell.2017.00018.
- 89 Foster LC, A. B., Sibinga NE, Shi C, Perrella MA, Haber E. Regulation of CD44 gene expression by the proinflammatory cytokine interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **273(32)**, 20341-20346, doi:10.1074/jbc.273.32.20341.
- 90 Aruffo A, S. I., Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.* **61(7)**, 1303-1313, doi:10.1016/0092-8674(90)90694-a.
- 91 McDonald B, K. P. Interactions between CD44 and Hyaluronan in Leukocyte Trafficking. *Front Immunol.* **6**, 68, doi:10.3389/fimmu.2015.00068.
- 92 Zhang G, Z. H., Liu Y, He Y, Wang W, Du Y, Yang C, Gao F. CD44 clustering is involved in monocyte differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* **46(7)**, 540-547, doi:10.1093/abbs/gmu042.
- 93 Acharya S, F. V., Lee JW, Rayborn ME, Rodriguez IR, Young WS 3rd, Hollyfield JG. . SPACRCAN, a novel human interphotoreceptor matrix hyaluronan-binding proteoglycan synthesized by photoreceptors and pinealocytes. *J Biol Chem.* **275(10)**, 6945-6955, doi:10.1074/jbc.275.10.6945.
- 94 Ishikawa M, S. Y., Yoshitomi T. . Structure and function of the interphotoreceptor matrix surrounding retinal photoreceptor cells. *Exp Eye Res.* **133**, 3-18, doi:10.1016/j.exer.2015.02.017.
- 95 Secundino I, L. A., Roupé KM, Wang X, Cole JN, Olson J, Ali SR, Dahesh S, Amayreh LK, Henningham A, Varki A, Nizet V. Host and pathogen hyaluronan signal through human siglec-9 to suppress neutrophil activation. *J Mol Med (Berl).* **94(2)**, 219-233, doi:10.1007/s00109-015-1341-8.
- 96 Iozzo RV, S. L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* **42**, 11-55, doi:10.1016/j.matbio.2015.02.003.
- 97 Milev, P., Maurel, P., Chiba, A., Mevissen, M., Popp, S., Yamaguchi, Y., & Margolis, R. K., and Margolis, R.U. Differential Regulation of Expression of Hyaluronan-Binding Proteoglycans in Developing Brain: Aggrecan, Versican, Neurocan, and Brevican. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **247(2)**, 207-212.
- 98 Wight TN, K. M., Evanko SP, Potter-Perigo S, Merrilees MJ. Versican and the regulation of cell phenotype in disease. *Biochim Biophys Acta.* **1840(8)**, 2441-2451, doi:10.1016/j.bbagen.2013.12.028.
- 99 TN., W. Arterial remodeling in vascular disease: a key role for hyaluronan and versican. *Front Biosci.* **13**, 4933-4937, doi:10.2741/3052.
- 100 Kawashima H, H. M., Hirose J, Nagakubo D, Plaas AH, Miyasaka M. . Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan, versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44. *J Biol Chem.* **275(45)**, 35448-35456, doi:10.1074/jbc.M003387200.
- 101 Kawashima H, A. K., Hirose M, Hirose J, Yamada S, Sugahara K, Miyasaka M. . Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcAbeta1/IdoAalpha1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines. *J Biol Chem.* **277(15)**, 12921-12930, doi:10.1074/jbc.M200396200.
- 102 Hardwick C, H. K., Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, Cripps V, Austen L, Nance DM, Turley EA. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol.* 1992 Jun;117(6):1343-50. doi: 10.1083/jcb.117.6.1343. Erratum in: *J Cell Biol.* 1992 Aug;118(3):753. doi: 10.1083/jcb.118.3.753. *J Cell Biol.* **118(3)**, 753, doi:10.1083/jcb.118.3.753.
- 103 Yang, B., Yang, B. L., Savani, R. C. & Turley, E. A. Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *Embo j* **13**, 286-296, doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06261.x (1994).

- 104 Turley, E. A., Austen, L., Vandeligt, K. & Clary, C. Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of ras-transformed cells. *J Cell Biol* **112**, 1041-1047, doi:10.1083/jcb.112.5.1041 (1991).
- 105 Wang C, E. J., Hou G, Li Q, Turley EA. The characterization of a human RHAMM cDNA: conservation of the hyaluronan-binding domains. *Gene*. **174**, 299-306, doi:10.1016/0378-1119(96)00080-7 (1996).
- 106 Assmann V, M. J., Fieber C, Hofmann M, Hart IR. The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells. *J Cell Sci* **111**, 1685–1694, doi:10.1002/path.941 (1999).
- 107 *Hmmrtm1a(EUCOMM)Hmgu*, <<https://www.informatics.jax.org/allele/MGI:5299824>> (2024).
- 108 Chao Wang, J. E., Guangpei Hou, Quan Li, Eva A. Turley. The characterization of a human RHAMM cDNA: conservation of the hyaluronan-binding domains. *Gene* **174**, 299-306 (1996).
- 109 Yang B, Z. L., Turley EA. Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM. *J Biol Chem*. **268(12)**, 8617-8623 (1993).
- 110 Zhou R, W. X., Skalli O. The hyaluronan receptor RHAMM/IHABP in astrocytoma cells: expression of a tumor-specific variant and association with microtubules. *J Neuro-Oncol*. **59**, 15-26, doi:10.1023/A:1016373015569 (2002).
- 111 Messam BJ, T. C., McCarthy JB, Nelson AC, Turley EA. RHAMM Is a Multifunctional Protein That Regulates Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. **22(19)**, 10313, doi:10.3390/ijms221910313.
- 112 Lin A, F. J., Chen X, Wang D, Wong M, Zhang G, Na J, Zhang T, Chen Z, Chen YT, Nancy Du YC. High levels of truncated RHAMM cooperate with dysfunctional p53 to accelerate the progression of pancreatic cancer. *Cancer Lett*. **514**, 79-89, doi:10.1016/j.canlet.2021.05.011 (2021).
- 113 Villegas-Ruíz V, S. M., Zentella-Dehesa A, de Oca EV, Román-Basaure E, Mantilla-Morales A, Dávila-Borja VM, Juárez-Méndez S. A case of cervical cancer expressed three mRNA variant of Hyaluronan-mediated motility receptor. *Int J Clin Exp Pathol*. **7(5)**, 2256-2264.
- 114 Misra S, H. V., Markwald RR, Ghatak S. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Front Immunol*. **6**, 201, doi:10.3389/fimmu.2015.00201.
- 115 Jain E, B. A., Duvaud S, Phan I, Redaschi N, Suzek BE, Martin MJ, McGarvey P, Gasteiger E. Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics*. **10**, 136, doi:10.1186/1471-2105-10-136.
- 116 Choi S, W. D., Chen X, Tang LH, Verma A, Chen Z, Kim BJ, Selesner L, Robzyk K, Zhang G, Pang S, Han T, Chan CS, Fahey TJ 3rd, Elemento O, Du YN. Function and clinical relevance of RHAMM isoforms in pancreatic tumor progression. *Mol Cancer*. **18(1)**, 29, doi:10.1186/s12943-019-1018-y.
- 117 Crainie M, B. A., Mant MJ, Pilarski LM. . Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) characterizes the malignant clone in multiple myeloma: identification of three distinct RHAMM variants. *Blood*. **93(5)**, 1684-1696.
- 118 Maxwell CA, R. E., Zhan F, Keats JJ, Adamia S, Strachan E, Crainie M, Walker R, Belch AR, Pilarski LM, Barlogie B, Shaughnessy J Jr, Reiman T. . RHAMM expression and isoform balance predict aggressive disease and poor survival in multiple myeloma. *Blood*. **104(4)**, 1151-1158, doi:10.1182/blood-2003-11-4079 (2004).
- 119 Assmann V, J. D., Marshall JF, Hart IR. The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *J Cell Sci*. **112 (Pt 22)**, 3943-3954, doi:10.1242/jcs.112.22.3943 (1999).
- 120 Hamilton SR, F. S., Paiwand FF, Tolg C, Veisheh M, Wang C, McCarthy JB, Bissell MJ, Koropatnick J, Turley EA. . The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells. *J Biol Chem*. **282(22)**, 16667-16680, doi:10.1074/jbc.M702078200 (2007).

- 121 Line A, S. Z., Stengrevics A, Silina K, Li G, Rees RC. Characterisation of tumour-associated antigens in colon cancer. *Cancer Immunol Immunother. Cancer Immunol Immunother.* **51(10)**, 574-582, doi:10.1007/s00262-002-0322-2 (2022).
- 122 Du YC, C. C., Klimstra DS, Varmus H. Receptor for hyaluronan-mediated motility isoform B promotes liver metastasis in a mouse model of multistep tumorigenesis and a tail vein assay for metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108(40)**, 16753-16758, doi:10.1073/pnas.1114022108 (2011).
- 123 Messam BJ, T. C., McCarthy JB, Nelson AC, Turley EA. RHAMM Is a Multifunctional Protein That Regulates Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 24;22(19):10313. doi: 10.3390/ijms221910313. PMID: 34638654; PMCID: PMC8508827. *Int J Mol Sci.* **22(19)**, 10313, doi:10.3390/ijms221910313 (2021).
- 124 Choi S, W. D., Chen X, Tang LH, Verma A, Chen Z, Kim BJ, Selesner L, Robzyk K, Zhang G, Pang S, Han T, Chan CS, Fahey TJ 3rd, Elemento O, Du YN. Function and clinical relevance of RHAMM isoforms in pancreatic tumor progression. *Mol Cancer.* **18(1):92**, doi:10.1186/s12943-019-1018-y (2019).
- 125 Tolg C, H. S., Morningstar L, Zhang J, Zhang S, Esguerra KV, Telmer PG, Luyt LG, Harrison R, McCarthy JB, Turley EA. RHAMM promotes interphase microtubule instability and mitotic spindle integrity through MEK1/ERK1/2 activity. *J Biol Chem.* **285(34)**, 26461-26474, doi:10.1074/jbc.M110.121491 (2010).
- 126 BP., T. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* **12(2)**, 79-87, doi:10.1006/scdb.2000.0244 (2001).
- 127 Hardwick C, H. K., Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, Cripps V, Austen L, Nance DM, Turley EA. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol.* **117(6)**, 1343-1350, doi:10.1083/jcb.117.6.1343.
- 128 Maxwell CA, K. J., Crainie M, Sun X, Yen T, Shibuya E, Hendzel M, Chan G, Pilarski LM. RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. *Mol Biol Cell.* **14**, 2262-2276, doi:10.1091/mbc.e02-07-0377 (2003).
- 129 Misra S, H. V., Markwald RR, Ghatak S. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Front Immunol.* **6**, 201, doi:10.3389/fimmu.2015.00201.
- 130 Jiang J, C.-G. R., Chen H, Schmitt A, Schmitt M, Maxwell CA. Multifunctional proteins bridge mitosis with motility and cancer with inflammation and arthritis. *ScientificWorldJournal.* **10**, 1244-1257, doi:10.1100/tsw.2010.141 (2010).
- 131 Klewes L, T. E., Prehm P. The hyaluronate synthase from a eukaryotic cell line. *Biochem J.* **290 (Pt 3)**, 791-795, doi:10.1042/bj2900791 (1993).
- 132 Maxwell CA, M. J., Turley E. Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? *J Cell Sci.* **121**, 925-932, doi:10.1242/jcs.022038 (2008).
- 133 Radisky DC, H. Y., Bissell MJ. Delivering the message: epimorphin and mammary epithelial morphogenesis. *Trends Cell Biol.* 2003 Aug;13(8):426-34. doi: 10.1016/s0962-8924(03)00146-6. PMID: 12888295; PMCID: PMC2933193. *Trends Cell Biol.* **13**, 426-434, doi:10.1016/s0962-8924(03)00146-6 (2003).
- 134 Turley EA, N. P., Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem.* 2002 Feb 15;277(7):4589-92. doi: 10.1074/jbc.R100038200. Epub 2001 Nov 20. PMID: 11717317. *J Biol Chem.* **277(7)**, 4589-4592, doi:10.1074/jbc.R100038200 (2002).
- 135 Yang B, Y. B., Savani RC, Turley EA. Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *EMBO J.* **13(2)**, 286-296, doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06261.x (1994).
- 136 Turley EA, A. L., Vandeligt K, Clary C. . Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of ras-transformed cells. *J Cell Biol.* **112**, 1041-1047, doi:10.1083/jcb.112.5.1041 (1991).
- 137 Manzanares D, M. M., Savani RC, Salathe M. Apical oxidative hyaluronan degradation stimulates airway ciliary beating via RHAMM and RON. . *Am J Respir Cell Mol Biol.*, doi:10.1165/rcmb.2006-0413OC (2007).

- 138 Samuel SK, H. R., Spearman MA, Wright JA, Turley EA, Greenberg AH. TGF-beta 1 stimulation of cell locomotion utilizes the hyaluronan receptor RHAMM and hyaluronan. *J Cell Biol.* **123**, 749-758, doi:10.1083/jcb.123.3.749 (1993).
- 139 Hall CL, Y. B., Yang X, Zhang S, Turley M, Samuel S, Lange LA, Wang C, Curpen GD, Savani RC, Greenberg AH, Turley EA. Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. *Cell.* **82(1)**, 19-26, doi:10.1016/0092-8674(95)90048-9 (1995).
- 140 Turley EA, A. L., Moore D, Hoare K. Ras-transformed cells express both CD44 and RHAMM hyaluronan receptors: only RHAMM is essential for hyaluronan-promoted locomotion. *Exp Cell Res.* **207(2)**, 277-282, doi:10.1006/excr.1993.1194 (1993).
- 141 Joycelyn Entwistle, S. Z., Baihua Yang, Carol Wong, Qun Li, Christine L. Hall, Jingbo A, Michael Mowat, Arnold H. Greenberg, Eva A. Turley. Characterization of the murine gene encoding the hyaluronan receptor RHAMM. *Gene* **163**, 233-238 (1995).
- 142 Tolg C, H. S., Nakrieko KA, Kooshesh F, Walton P, McCarthy JB, Bissell MJ, Turley EA. Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair. *J Cell Biol.* **175(6)**, 1017-1028, doi:10.1083/jcb.200511027 (2006).
- 143 Chen YT, C. Z., Du YN. . Immunohistochemical analysis of RHAMM expression in normal and neoplastic human tissues: a cell cycle protein with distinctive expression in mitotic cells and testicular germ cells. *Oncotarget.* **9(30)**, 20941-20952, doi:10.18632/oncotarget.24939 (2018).
- 144 Pilarski LM, M.-S. A., Belch AR, Yang B, Savani RC, Turley EA. RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, on normal human lymphocytes, thymocytes and malignant B cells: a mediator in B cell malignancy? *Leuk Lymphoma.* **14(5-6)**, 363-374, doi:10.3109/10428199409049691 (1994).
- 145 Savani RC, W. C., Yang B, Zhang S, Kinsella MG, Wight TN, Stern R, Nance DM, Turley EA. Migration of bovine aortic smooth muscle cells after wounding injury. The role of hyaluronan and RHAMM. *J Clin Invest.* **95**, 1158-1168, doi:10.1172/jci117764 (1995).
- 146 Tolg C, H. S., Nakrieko KA, Kooshesh F, Walton P, McCarthy JB, Bissell MJ, Turley EA. Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair. *J Cell Biol.* **175**, 1017-1028, doi:10.1083/jcb.200511027 (2006).
- 147 Missinato MA, T. K., Romano N, Carroll JA, Tsang M. Extracellular component hyaluronic acid and its receptor Hmmer are required for epicardial EMT during heart regeneration. *Cardiovasc Res.* **107(4)**, 487-498, doi:10.1093/cvr/cvv190 (2015).
- 148 Jopling C, S. E., Raya M, Martí M, Raya A, Izpisua Belmonte JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature.* **464(7288)**, 606-609, doi:10.1038/nature08899 (2010).
- 149 Kikuchi K, H. J., Werdich AA, Anderson RM, Fang Y, Egnaczyk GF, Evans T, Macrae CA, Stainier DY, Poss KD. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature.* **464(7288)**, 601-605, doi:10.1038/nature08804 (2010).
- 150 Lien CL, S. M., Makino S, Weber GJ, Keating MT. Gene expression analysis of zebrafish heart regeneration. *PLoS Biol.* **4(8)**, e260, doi:10.1371/journal.pbio.0040260 (2006).
- 151 Li H, K. T., Moll J, Frappart L, Herrlich P, Heuer H, et al. Spindle misorientation of cerebral and cerebellar progenitors is a mechanistic cause of megalencephaly. *Stem Cell Rep* **9**, 1071–1080, doi:10.1016/j.stemcr.2017.08.013 (2017).
- 152 Cui Z, L. J., Cheong N, Longoria C, Cao G, DeLisser H.M, et al. The receptor for hyaluronan-mediated motility (CD168) promotes inflammation and fibrosis after acute lung injury. . *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*, doi:10.1016/j.matbio.2018.08.002 (2019 78–9:255–71).
- 153 He Z, M. L., Connell M, Maxwell CA. Hyaluronan mediated motility receptor (HMMR) encodes an evolutionarily conserved homeostasis, mitosis, and meiosis regulator rather than a hyaluronan receptor. *Cells* **9**, 1-14, doi:10.3390/cells9040819 (2020).

- 154 Tarullo SE, H. Y., Daughters C, Knutson TP, Henzler CM, Price MA, Shanley R, Witschen P, Tolg C, Kaspar RE, Hallstrom C, Gittsovich L, Sulciner ML, Zhang X, Forster CL, Lange CA, Shats O, Desler M, Cowan KH, Yee D, Schwertfeger KL, Turley EA, McCarthy JB, Nelson AC. Receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) defines an invasive niche associated with tumor progression and predicts poor outcomes in breast cancer patients. *J Pathol.* **260(3)**, 289-303, doi:10.1002/path.6082 (2023).
- 155 Niedworok C, K. I., Röck K, Vom Dorp F, Szarvas T, Heß J, Freudenberger T, Melchior-Becker A, Rübber H, Fischer JW. The impact of the receptor of hyaluronan-mediated motility (RHAMM) on human urothelial transitional cell cancer of the bladder. *PLoS One.* **8(9)**, e75681, doi:10.1371/journal.pone.0075681 (2013).
- 156 Csoka AB, F. G., Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* **20(8)**, 499-508, doi:10.1016/s0945-053x(01)00172-x.
- 157 Bourguignon V, F. B. Respective roles of hyaluronidases 1 and 2 in endogenous hyaluronan turnover. *FASEB J.* **30(6)**, 2108-2114, doi:10.1096/fj.201500178R.
- 158 Volpi N, S. J., Stern R, Soltés L. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr Med Chem.* **16**, 1718-1745, doi:10.2174/092986709788186138 (2009).
- 159 Fraser JR, L. T. Turnover and metabolism of hyaluronan. *Ciba Found Symp.* **143**, 41-53 (1989).
- 160 Hofinger ES, H. J., Oetl M, Bernhardt G, Buschauer A. Isoenzyme-specific differences in the degradation of hyaluronic acid by mammalian-type hyaluronidases. *Glycoconj J.* **25(2)**, 101-109, doi:10.1007/s10719-007-9058-8.
- 161 Chowdhury, B., Hemming, R., Hombach-Klonisch, S., Flamion, B., and Triggs Raine, B. Murine hyaluronidase 2 deficiency results in extracellular hyaluronan accumulation and severe cardiopulmonary dysfunction. *J Biol Chem* **288(1)**, 520-528 (2013).
- 162 Jiang D, L. J., Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R, Noble PW. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med.* **11(11)**, 1173-1179, doi:10.1038/nm1315.
- 163 Jiang D, L. J., Noble PW. . Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev.* **91(1)**, 221-264, doi:10.1152/physrev.00052.2009.
- 164 Domanegg K, S. J., Schmaus A. CEMIP, a Promising Biomarker That Promotes the Progression and Metastasis of Colorectal and Other Types of Cancer. *Cancers (Basel)* **14**, doi:10.3390/cancers14205093 (2022).
- 165 Tammi, M. I., Oikari, S., Pasonen-Seppanen, S., Rilla, K., Auvinen, P., Tammi, R.H. Activated hyaluronan metabolism in the tumor matrix - Causes and consequences. *Matrix Biol.* **78-79**, 147-164 (2019).
- 166 Dahl LB, D. I., Engström-Laurent A, Granath K. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann Rheum Dis.* **44(12)**, 817-822, doi:10.1136/ard.44.12.817.
- 167 de la Motte CA, H. V., Drazba J, Bandyopadhyay SK, Strong SA. Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. . *Am J Pathol.* **163(1)**, 121-133, doi:10.1016/s0002-9440(10)63636-x.
- 168 Hällgren R, S. T., Laurent TC, Modig J. Accumulation of hyaluronan (hyaluronic acid) in the lung in adult respiratory distress syndrome. . *Am Rev Respir Dis.* **139(3)**, 682-687, doi:10.1164/ajrccm/139.3.682.
- 169 Waldenström A, M. H., Gerdin B, Hällgren R. . Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction. *J Clin Invest.* **88(5)**, 1622-1628, doi:10.1172/JCI115475.
- 170 Nieuwdorp M, M. M., Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. . *Curr Opin Lipidol.* **16(5)**, 507-511, doi:10.1097/01.mol.0000181325.08926.9c.

- 171 Webber J, M. S., Steadman R, Phillips A. Hyaluronan orchestrates transforming growth factor-beta1-dependent maintenance of myofibroblast phenotype. *J Biol Chem.* **284**, 9083-9092, doi:10.1074/jbc.M806989200 (2009).
- 172 Travis JA, H. M., Wong JM, Wagner WD, Geary RL. Hyaluronan enhances contraction of collagen by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts: Role of cd44 and implications for constrictive remodeling. *Circ Res.* **88**, 77-83 (2001).
- 173 Meran S, T. D., Stephens P, Enoch S, Martin J, Steadman R, Phillips AO. Hyaluronan facilitates transforming growth factor-beta1-mediated fibroblast proliferation. *J Biol Chem.* **283**, 6530-6545, doi:10.1074/jbc.M704819200 (2008).
- 174 Meran S, L. D., Simpson R, Martin J, Wells A, Steadman R, Phillips AO. Hyaluronan facilitates transforming growth factor- β 1-dependent proliferation via CD44 and epidermal growth factor receptor interaction. *J Biol Chem.* **286**, 17618-17630, doi:10.1074/jbc.M111.226563. (2011).
- 175 Saxena A, C. W., Su Y, Rai V, Uche OU, Li N, Frangogiannis NG. Il-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium. *J Immunol.* **191**, 4838-4848 (2013).
- 176 Meran S, M. J., Luo DD, Steadman R, Phillips A. Interleukin-1beta induces hyaluronan and cd44-dependent cell protrusions that facilitate fibroblast-monocyte binding. *Am J Pathol.* **182**, 2223-2240 (2013).
- 177 Petz A, G. M., Gorski DJ, Abrams M, Piroth M, Schneckmann R, Homann S, Müller J, Hartwig S, Lehr S, Yamaguchi Y, Wight TN, Gorressen S, Ding Z, Kötter S, Krüger M, Heinen A, Kelm M, Gödecke A, Flögel U, Fischer JW. Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury. *Circ Res.* **124**, 1433-1447, doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313285 (2019).
- 178 Piroth M, G. D., Hundhausen C, Petz A, Gorressen S, Semmler D, Zabri H, Hartwig S, Lehr S, Kelm M, Jung C, Fischer JW. Hyaluronan synthase 3 is protective after cardiac ischemia-reperfusion by preserving the T cell response. *Matrix Biol.* **112**, 116-131, doi:10.1016/j.matbio.2022.08.008 (2022).
- 179 *BioRender*, <BioRender.com.> (2024).
- 180 Linke WA, P. V., Pollack GH. Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophys J.* **67**, 782-792, doi:10.1016/S0006-3495(94)80538-7 (1994).
- 181 Petz, A. *Bedeutung der Hyaluronsäure nach kardialer Ischämie und Reperfusion*, (2019).
- 182 Mak, K. M., Png, C. Y. M. & Lee, D. J. Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *The Anatomical Record* **299**, 613-629, doi:<https://doi.org/10.1002/ar.23330> (2016).
- 183 Birk, D. E. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron* **32**, 223-237 (2000).
- 184 Mao JR, B. J. The Ehlers-Danlos syndrome: on beyond collagens. *J Clin Invest.* **107**, 1063-1069, doi:10.1172/JCI12881 (2001).
- 185 Cescon, M., Gattazzo, F., Chen, P. & Bonaldo, P. Collagen VI at a glance. *Journal of Cell Science* **128**, 3525-3531, doi:10.1242/jcs.169748 (2015).
- 186 Arntzen, K. *et al.* COLLAGEN RELATED MUSCLE DISEASES: EP.56 Collagen VI-related neuropathy. *Neuromuscular Disorders* **31**, S66, doi:10.1016/j.nmd.2021.07.081 (2021).
- 187 Chistiakov, D. A., Killingsworth, M. C., Myasoedova, V. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation* **97**, 4-13, doi:10.1038/labinvest.2016.116 (2017).
- 188 Chistiakov, D. A., Killingsworth, M. C., Myasoedova, V. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* **97**, 4-13, doi:10.1038/labinvest.2016.116 (2017).
- 189 Alcaide-Ruggiero, L., Cugat, R. & Domínguez, J. M. Proteoglycans in Articular Cartilage and Their Contribution to Chondral Injury and Repair Mechanisms. *Int J Mol Sci* **24**, doi:10.3390/ijms241310824 (2023).
- 190 Järveläinen, H., Sainio, A. & Wight, T. N. Pivotal role for decorin in angiogenesis. *Matrix Biol* **43**, 15-26, doi:10.1016/j.matbio.2015.01.023 (2015).

- 191 Neill, T. *et al.* Decorin antagonizes the angiogenic network: concurrent inhibition of Met, hypoxia inducible factor 1 α , vascular endothelial growth factor A, and induction of thrombospondin-1 and TIMP3. *J Biol Chem* **287**, 5492-5506, doi:10.1074/jbc.M111.283499 (2012).
- 192 Bocian, C. *et al.* Decorin potentiates interferon- γ activity in a model of allergic inflammation. *J Biol Chem* **288**, 12699-12711, doi:10.1074/jbc.M112.419366 (2013).
- 193 Borges, M. C., Narayanan, V., Iozzo, R. V. & Ludwig, M. S. Deficiency of decorin induces expression of Foxp3 in CD4⁺CD25⁺ T cells in a murine model of allergic asthma. *Respirology* **20**, 904-911, doi:10.1111/resp.12485 (2015).
- 194 Järveläinen, H. *et al.* A role for decorin in cutaneous wound healing and angiogenesis. *Wound Repair Regen* **14**, 443-452, doi:10.1111/j.1743-6109.2006.00150.x (2006).
- 195 Merck. *Decorin*, <<https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/technical-article/protein-biology/enzyme-activity-assays/decorin>> (2024).
- 196 MacBeath, J. R., Shackleton, D. R. & Hulmes, D. J. Tyrosine-rich acidic matrix protein (TRAMP) accelerates collagen fibril formation in vitro. *J Biol Chem* **268**, 19826-19832 (1993).
- 197 Liu, X. *et al.* Dermato-pontin promotes adhesion, spreading and migration of cardiac fibroblasts in vitro. *Matrix Biol* **32**, 23-31, doi:10.1016/j.matbio.2012.11.014 (2013).
- 198 Shen, Y. W., Zhou, Y. D., Chen, H. Z., Luan, X. & Zhang, W. D. Targeting CTGF in Cancer: An Emerging Therapeutic Opportunity. *Trends Cancer* **7**, 511-524, doi:10.1016/j.trecan.2020.12.001 (2021).
- 199 Rachfal, A. W. & Brigstock, D. R. Structural and functional properties of CCN proteins. *Vitam Horm* **70**, 69-103, doi:10.1016/s0083-6729(05)70003-0 (2005).
- 200 Sabbah, M. *et al.* CCN5, a novel transcriptional repressor of the transforming growth factor β signaling pathway. *Mol Cell Biol* **31**, 1459-1469, doi:10.1128/mcb.01316-10 (2011).
- 201 Dhar, G. *et al.* Loss of WISP-2/CCN5 signaling in human pancreatic cancer: a potential mechanism for epithelial-mesenchymal-transition. *Cancer Lett* **254**, 63-70, doi:10.1016/j.canlet.2007.02.012 (2007).
- 202 Mason, H. R., Lake, A. C., Wubben, J. E., Nowak, R. A. & Castellot, J. J., Jr. The growth arrest-specific gene CCN5 is deficient in human leiomyomas and inhibits the proliferation and motility of cultured human uterine smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod* **10**, 181-187, doi:10.1093/molehr/gah028 (2004).
- 203 Pennica, D. *et al.* WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14717-14722, doi:10.1073/pnas.95.25.14717 (1998).
- 204 Nguyen, M. T. *et al.* The matricellular protein CCN5 induces apoptosis in myofibroblasts through SMAD7-mediated inhibition of NF κ B. *PLoS One* **17**, e0269735, doi:10.1371/journal.pone.0269735 (2022).
- 205 Cui, J. & Zhang, J. Cartilage Oligomeric Matrix Protein, Diseases, and Therapeutic Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 9253 (2022).
- 206 Mende, A. *Die Big Five der Sekundärprophylaxe*, <<https://www.pharmazeutische-zeitung.de/die-big-five-der-sekundaerprophylaxe/>> (2019).
- 207 Smiseth, O. A., Torp, H., Opdahl, A., Haugaa, K. H. & Urheim, S. Myocardial strain imaging: how useful is it in clinical decision making? *Eur Heart J* **37**, 1196-1207, doi:10.1093/eurheartj/ehv529 (2016).
- 208 Damodarasamy, M. *et al.* Hyaluronan enhances wound repair and increases collagen III in aged dermal wounds. *Wound Repair and Regeneration* **22**, 521-526, doi:<https://doi.org/10.1111/wrr.12192> (2014).
- 209 Tolg C, M. J., Yazdani A, Turley EA. Hyaluronan and RHAMM in wound repair and the "cancerization" of stromal tissues. . *Biomed Res Int.*, doi:doi: 10.1155/2014/103923 (2014).
- 210 Venugopal H, H. A., Humeres C, Frangogiannis NG. Properties and Functions of Fibroblasts and Myofibroblasts in Myocardial Infarction. *Cells*. **11**, doi:10.3390/cells11091386 (2022).

- 211 Tseng, S., Reddi, A. H. & Di Cesare, P. E. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP): A Biomarker of Arthritis. *Biomark Insights* **4**, 33-44, doi:10.4137/bmi.s645 (2009).
- 212 Wang H, Y. Z., Wang B, Li B, Lv H, He J, Huang Y, Cui Z, Ma Q, Li T, Fu Y, Tan X, Liu Y, Wang S, Wang C, Kong W, Zhu Y. COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein), a Novel PIEZO1 Regulator That Controls Blood Pressure. *Hypertension*. **79**, 549-561, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17972 (2022).
- 213 Chen, D.-d. *et al.* Serum cartilage oligomeric matrix protein is decreased in patients with pulmonary hypertension: a potential protective factor. *Pulmonary Circulation* **11**, 0271678X20978861, doi:<https://doi.org/10.1177/20458940211031111> (2021).
- 214 Huang, Y. *et al.* Deficiency of cartilage oligomeric matrix protein causes dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* **108**, 374, doi:10.1007/s00395-013-0374-9 (2013).
- 215 Rosenberg, K., Olsson, H., Mörgelin, M. & Heinegård, D. Cartilage Oligomeric Matrix Protein Shows High Affinity Zinc-dependent Interaction with Triple Helical Collagen*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 20397-20403, doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20397> (1998).
- 216 Zachou K, G. S., Shums Z, Gatselis NK, Koukoulis GK, Norman GL, Dalekos GN. COMP serum levels: A new non-invasive biomarker of liver fibrosis in patients with chronic viral hepatitis. . *Eur J Intern Med*. **38**, 83-88, doi:10.1016/j.ejim.2017.01.007 (2017).
- 217 Magdaleno, F. *et al.* Cartilage oligomeric matrix protein participates in the pathogenesis of liver fibrosis. *Journal of Hepatology* **65**, 963-971, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.06.003> (2016).
- 218 Gatselis, N. K. *et al.* Serum Cartilage Oligomeric Matrix Protein and Golgi Protein-73: New Diagnostic and Predictive Tools for Liver Fibrosis and Hepatocellular Cancer? *Cancers* **13**, 3510 (2021).
- 219 Vuga LJ, M. J., Pandit K, Ben-Yehudah A, Chu Y, Richards T, et al. Cartilage Oligomeric Matrix Protein in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE* **8**, e83120, doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083120> (2013).
- 220 Park, S., Ranjbarvaziri, S., Zhao, P. & Ardehali, R. Cardiac Fibrosis Is Associated With Decreased Circulating Levels of Full-Length CILP in Heart Failure. *JACC Basic Transl Sci* **5**, 432-443, doi:10.1016/j.jacbts.2020.01.016 (2020).
- 221 Hartmann, F. *et al.* SMC-Derived Hyaluronan Modulates Vascular SMC Phenotype in Murine Atherosclerosis. *Circ Res* **129**, 992-1005, doi:10.1161/circresaha.120.318479 (2021).
- 222 Takemoto S, M. T., Kusachi S, Iwabu A, Hirohata S, Nakamura K, Sezaki S, Havashi J, Suezawa C, Ninomiya Y, Tsuji T. Increased expression of dermatopontin mRNA in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats: comparison with decorin and type I collagen mRNAs. *Basic Res Cardiol*. **97**, 461-468, doi:10.1007/s00395-002-0371-x (2022).
- 223 Liu X, M. L., Shi Q, Liu S, Cui C, Hu S, Wei Y. Dermatopontin promotes adhesion, spreading and migration of cardiac fibroblasts in vitro. *Matrix Biol*. **32**, doi:10.1016/j.matbio.2012.11.014 (2013).
- 224 Kim, T. *et al.* Dermatopontin in Skeletal Muscle Extracellular Matrix Regulates Myogenesis. *Cells* **8**, doi:10.3390/cells8040332 (2019).
- 225 Sidgwick, G. P. & Bayat, A. Extracellular matrix molecules implicated in hypertrophic and keloid scarring. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **26**, 141-152, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04200.x> (2012).
- 226 Samuel, S. K. *et al.* TGF-beta 1 stimulation of cell locomotion utilizes the hyaluronan receptor RHAMM and hyaluronan. *J Cell Biol* **123**, 749-758, doi:10.1083/jcb.123.3.749 (1993).
- 227 Park, D. *et al.* Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGFβ receptor interaction via CD44-PKCδ. *Mol Cells* **33**, 563-574, doi:10.1007/s10059-012-2294-1 (2012).

- 228 Krishnaswamy, V. R. & Korrapati, P. S. Role of dermatopontin in re-epithelialization: implications on keratinocyte migration and proliferation. *Sci Rep* **4**, 7385, doi:10.1038/srep07385 (2014).

12 Posterpräsentation

Angelika Pastuschka, Anne Petz, Daniel J Gorski, Luisa Peterburs, Simone Gorressen, Marco Piroth, Theresa Hube, Lennart Gebert, Anika Prinz, Karl Köhrer, Florian Funk, Katharina Bottermann, Tobias Lautwein, Jens W. Fischer

Receptor of Hyaluronan-Mediated Motility (RHAMM) confers protection after acute cardiac ischemia

90. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 2024 in München vom 13.-15.04.2014 (Poster).

13 Lebenslauf

Zur Person

Name	Angelika Juliette Pastuschka
Geburtsdatum	06.07.1992
Geburtsort	Dinslaken
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig, 2 Kinder

Promotion

02/2019 - 07/2024	Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf Doktorvater: Professor Dr. Jens W. Fischer Thema: „Bedeutung des Rezeptors RHAMM (<i>Receptor for Hyaluronan Mediated Motility</i>) für die Heilung nach kardialer Ischämie und Reperfusion
-------------------	---

Weiterbildung

Seit 03/2019	Weiterbildung zur Fachapothekerin im Bereich Arzneimittelinformation
--------------	--

Studium

11/2018	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Erteilung der Approbation als Apotheker
05/2018 – 10/2018	Praktisches Jahr in der Rathausapotheke in München am Marienplatz
11/2017 – 04/2018	Praktisches Jahr bei Bayer AG in Berlin Abteilung für Parenteralherstellung
04/2013 – 10/2017	Pharmaziestudium an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
10/2012- 03/2013	Studium an der Europa-Universität Viadrina in Frankfurt an der Oder und in Slubice (Polen); Fach: German and Polish Law

Schule

2003 bis 2012	Städt. Gymnasium Goch (Abitur)
1999-2003	Niers-Kendel-Grundschule in Goch-Hassum

14 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer, für die Möglichkeit bedanken, dieses spannende Projekt unter seiner Leitung durchführen zu können. Ich danke ihm ganz besonders dafür, dass er mir trotz meiner Schwangerschaften die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen. Alle *Meetings* und Ideen im Konglomerat der Arbeitsgruppe haben letztendlich zum erfolgreichen Abschluss dieses Projektes geführt.

Innerhalb des Sonderforschungsbereichs 1116 und während meiner Tätigkeit als Doktorandin am Institut für Pharmakologie konnte ich viele Erfahrungen im Bereich der praktischen Laborarbeit sammeln, interessante Vorträge von erstklassigen Wissenschaftlern hören und auch Einblicke in andere spannende Projekte gewinnen.

Ich danke Herrn Professor Dr. Axel Gödecke für die freundliche Übernahme des Korreferats. Im Labor stand mir in erster Linie Frau Annika Zimmermann zur Seite und war mir fachlich stets eine große Hilfe. Weiterhin möchte ich mich bei Martina Hübel, Maria Bräuer, Marina Vidakovic, Ebelin Maruyama, Kirsten Bartkowski und Frau Petra Pieres für ihre tatkräftige Unterstützung in diesem Projekt bedanken. Natürlich gilt mein Dank auch allen aktuellen und ehemaligen Kollegen. Es hat mir immer Spaß gemacht, mit euch im Team zu arbeiten. Bei Frau Dr. Simone Gorressen möchte ich mich ganz herzlich für die operative Durchführung der Infarkte bedanken, ohne die dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre. Auch bei Herrn Dr. Florian Funk bedanke ich mich für die unterstützende Durchführung der Western-Blot Analyse. Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Anne Petz für das Korrektur lesen und die stete Unterstützung während meiner zwei Schwangerschaften während der Promotionszeit. Sie stand mir sowohl emotional als auch fachlich immer zur Seite und das werde ich ihr nie vergessen. Ein großes Dankeschön gilt auch ihrem Ehemann Dr. Daniel Gorski. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Christian Hundhausen für das schnelle und sehr hilfreiche Korrektur lesen. Bedanken möchte ich mich auch bei den Kolleginnen und Kollegen anderer Institute, die im Rahmen von Kooperationen für den Fortschritt dieses Projektes verantwortlich waren. Mein Dank gilt Herrn Dr. Sebastian Kötter für die Durchführung der *Stiffness*-Messungen und Herrn Professor Dr. Ulrich Flögel für die Durchführung der MRT-Untersuchungen. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Martina Krüger, Dr. Sandra Berger und Kathryn Schellen für die organisatorische Unterstützung während meiner Schwangerschaften bedanken. Der größte Dank gilt meiner Familie, ohne deren Unterstützung ich diese Promotion niemals hätte abschließen können. Ich danke meiner Mutter für die Betreuung meiner Kinder und ich danke meinen Kindern Isabella und Paul, in denen ich immer wieder die Motivation gefunden habe, diese Promotion erfolgreich abzuschließen.

15 Eidesstattliche Versicherung

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

Düsseldorf, den 04.09.2024

Angelika Juliette Pastuschka