

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Martin Canis



## **Regulatorische Erkenntnisse in der Arteriogenese und der Angiogenese**

Kumulative Habilitationsschrift  
Zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach

### **Hals-Nasen-Ohrenheilkunde**

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München

vorgelegt von

Dr. med. Manuel Lasch

aus Augsburg

2024

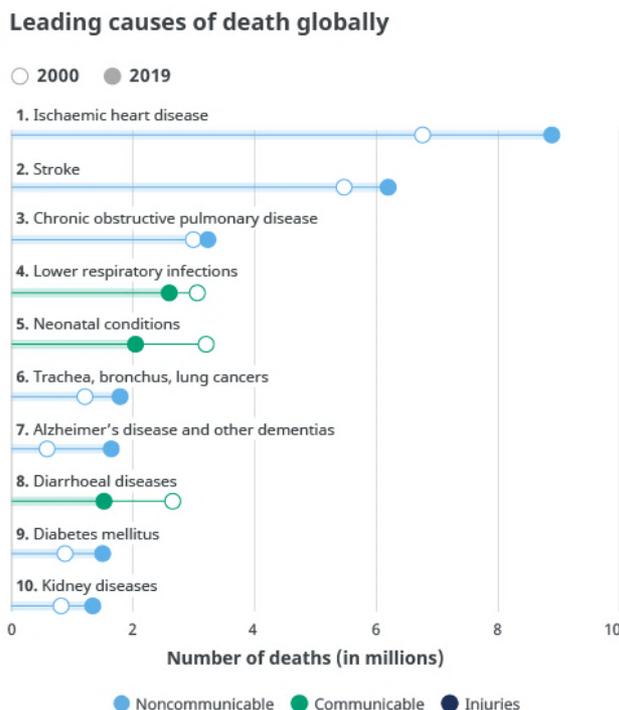
# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1 Hintergrund.....	3
1.2 Unterscheidung Arteriogenese und Angiogenese .....	4
<b>2. Zielsetzung.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>7</b>
3.1. Übersicht der in der Habilitationsschrift zusammengefassten Originalarbeiten.....	7
3.2. Bestimmung der Schubspannung <i>in vivo</i> bei der Arteriogenese.....	8
3.3. Darstellung der Leukozyten Rekrutierung <i>in vivo</i> bei der Arteriogenese .....	10
3.4. Die Rolle von B- und T-Zellen bei der Arteriogenese.....	13
3.5. Der Effekt von RNase A Behandlung auf die Angiogenese.....	17
3.6. Die Rolle von “cold-inducible RNA-binding protein” (CIRP) bei der Angiogenese.....	22
<b>4. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>26</b>
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>29</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>32</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>33</b>
<b>8. Vollständiges Schriftenverzeichnis.....</b>	<b>34</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>38</b>
<b>10. Versicherung an Eides Statt.....</b>	<b>39</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Hintergrund

Weltweit sind trotz intensiver Forschungsarbeiten Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie der Myokardinfarkt, der Schlaganfall oder periphere arterielle Verschlusskrankheiten nach wie vor die Hauptursache für Morbidität und Tod (Abbildung 1) [1]. Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten schwer betroffener Patientinnen und Patienten stellen meist nur invasive Verfahren wie die perkutane transluminale Angioplastie, die perkutane transluminale Koronarangioplastie oder eine Bypass-Operation dar [2]. Der menschliche Körper besitzt dabei eine eigenständige, präventive Möglichkeit Kollateralgefäße um ein stenosierendes oder verschlossenes Blutgefäß wachsen zu lassen um somit den oben genannten Erkrankungen vorzubeugen. Dieser Prozess wird als Arteriogenese bezeichnet. Genauer betrachtet beschreibt die Arteriogenese das Wachstum eines natürlichen Gefäßbypasses und tritt als adaptive Reaktion des Körpers auf einen progressiven Gefäßverschluss auf [2]. Zur Entwicklung nicht-invasiver Behandlungsmöglichkeiten für diese Patienten werden große Forschungsanstrengungen unternommen um die molekularen Mechanismen der Arteriogenese genauer zu verstehen. Dabei ist die komplette mechanistisch-physiologische Entschlüsselung dieses Prozesses von größter Relevanz um daraus folgend Angriffspunkte für eine gezielte medikamentöse Beeinflussung dieses Prozesses zu ermöglichen.



Source: WHO Global Health Estimates.

**Abbildung 1 (Quelle: WHO [1]).** Führende Todesursachen weltweit. Die Übersicht zeigt die 10 häufigsten Todesursachen weltweit, wobei die ischämische Herzkrankheit und der Schlaganfall die zwei häufigsten Todesursachen darstellen.

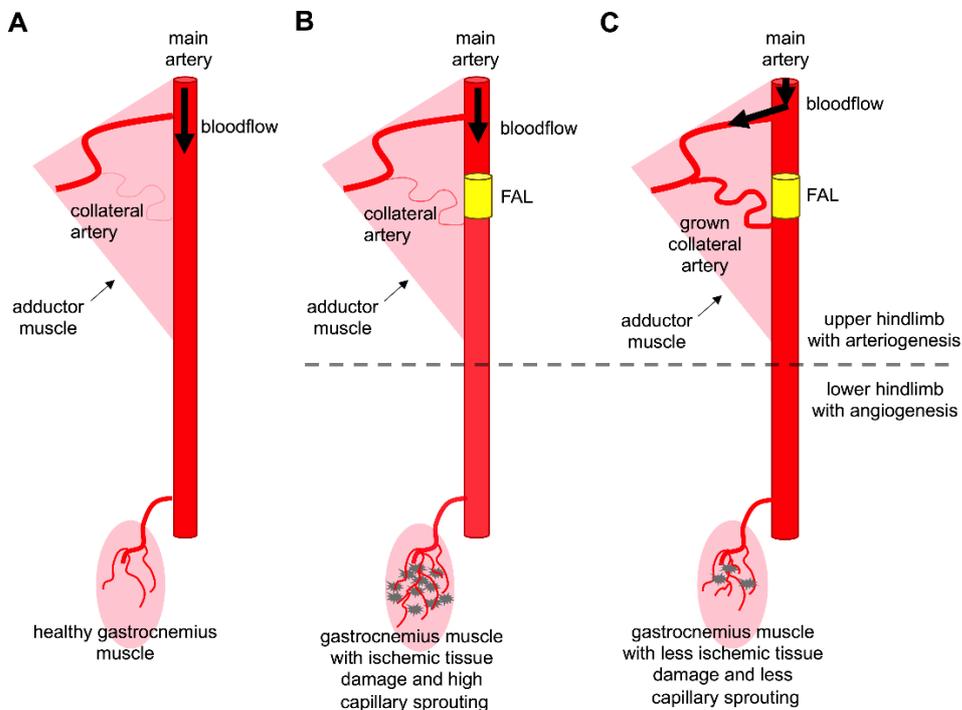
## 1.2. Unterscheidung Arteriogenese und Angiogenese

Die Bildung neuer Kapillaren durch Kapillarsprossung [3] oder Kapillarteilung [4] wird als Angiogenese bezeichnet. Die Angiogenese ist einerseits bei einigen physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Wundheilung [5] beteiligt. Andererseits ist die Angiogenese auch Folge bzw. Bestandteil vieler pathophysiologischer Prozesse wie dem Tumorwachstum [6], der diabetischen Retinopathie [7] oder dem chronischen oder akuten Verschluss eines arteriellen Gefäßes, häufig ausgelöst durch Arteriosklerose [8].

Durch einen Gefäßverschluss entsteht eine Minderversorgung des distal des Gefäßverschlusses gelegenen Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff und es entsteht eine Ischämie (Abbildung 2A, B). Durch die Minderversorgung mit Nährstoffen und insbesondere Sauerstoff ist die sauerstoffabhängige Hydroxilierung des Transkriptionsfaktor „hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$ “ (HIF-1  $\alpha$ ) gehemmt [9]. In gesundem Gewebe wird HIF-1  $\alpha$  nach Hydroxilierung ubiquitinyliert und über Proteasome abgebaut [9, 10]. Durch die, in der Ischämie, verminderte Hydroxilierung, kommt es folglich zu erhöhten Mengen von HIF-1  $\alpha$ . Nach Migration in den Zellkern beeinflusst es hier als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Gene [10]. Eines dieser Gene codiert für den „vascular endothelial growth factor A“ (VEGF-A), den stärksten bekannten angiogenen Wachstumsfaktor [10, 11]. VEGF-A, unter anderem freigesetzt von Leukozyten [12], stimuliert anschließend die Angiogenese [13] (Abbildung 2B).

Der chronische oder akute Verschluss eines arteriellen Gefäßes stellt nicht nur die Grundlage der Angiogenese, sondern auch die der Arteriogenese (Abbildung 2C) dar. Dabei beschreibt die Arteriogenese die Bildung von Kollateralkreisläufen, auch natürliche Bypässe genannt, um ein stenosierendes bzw. verschlossenes Blutgefäß. Da das Gewebe, in dem sich die präexistenten Kollateralgefäße befinden, nicht mit Nährstoffen oder Sauerstoff unterversorgt und folglich nicht ischämisch ist, ist dieser Prozess im Gegensatz zur Angiogenese nicht Hypoxie-abhängig [14, 15]. In den präexistenten Kollateralgefäßen kommt es durch den Verschluss des arteriellen Hauptblutgefäßes aufgrund der Umleitung des Blutes in diese Kollateralkreisläufe zu einer erhöhten Schubspannung. Diese erhöhte Schubspannung ist die Grundlage und der Stimulus der Arteriogenese [16, 17]. Über die anschließende Aktivierung des VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR2) zusammen mit dem Ko-Rezeptor Neuropilin-1 (NRP-1) durch VEGF-A und extrazelluläre RNA [12, 18] werden Leukozyten rekrutiert. Diese aktivieren nach Extravasation Mastzellen, welche durch die Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Zytokinen und Chemokinen weitere Leukozyten rekrutieren und hierüber das Gefäßwachstum

stimulieren [19]. Dadurch ist es möglich, dass diese Kollateralgefäße im Verlauf die Funktion des verschlossenen Gefäßes übernehmen und den Bereich distal des Gefäßverschlusses erneut mit ausreichend Blut- und Nährstoffen versorgen können. (Abbildung 2 C).



**Abbildung 2 (aus Lasch et al. [20]).** Die Arteriogenese im Oberschenkel schützt den M. gastrocnemius im Unterschenkel vor Ischämie. **(A)** Die Aufgabe arterieller Blutgefäße ist es Blut durch den Körper zu leiten und über Kapillaren Organe und Muskelgewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. In der hinteren Extremität versorgt die Femoralarterie den Unterschenkel mit Blut. **(B)** Bei Verschluss dieser Arterie aufgrund einer Stenose oder operativer Femoralarterienligatur (FAL) entsteht eine Ischämie im distal gelegenen M. gastrocnemius, was zu Gewebeschäden und Bildung neuer Kapillaren (Angiogenese) führt. **(C)** Ein effektives Kollateralarterienwachstum (Arteriogenese) im Oberschenkel mit Kompensation der Funktion der verschlossenen (Femoral-)Arterie verhindert eine schwere ischämische Gewebeschädigung im Unterschenkel und macht die Bildung neuer Kapillaren überflüssig.

## 2. Zielsetzung

Intensive Forschungsarbeiten der letzten Jahre konnten weite Teile des Prozesses der Arteriogenese und auch Angiogenese aufklären [3, 18, 19]. Dabei ist es jedoch nach wie vor nicht gelungen, die Prozesse in ihrer Gesamtheit zu entschlüsseln und medikamentöse Ansatzpunkte zu schaffen, so dass nach wie vor keine zugelassenen medikamentösen Therapien existieren, um die Arteriogenese gezielt und mit ausreichendem klinischem Erfolg zu fördern. Darüber hinaus sind die medikamentösen Therapieoptionen zur Modulation der Angiogenese mangels vollständiger Aufklärung des Prozesses eingeschränkt. Die hier zusammengefasste Habilitationsarbeit wurde daher mit dem Ziel durchgeführt, durch Grundlagenforschung neue regulatorische Erkenntnisse in der Arteriogenese und Angiogenese zu gewinnen, die im Laufe der Zeit zur Etablierung neuer medikamentöser Therapieoptionen beitragen können.

Folgende Fragestellungen wurden in den zusammengefassten Originalarbeiten erörtert:

1. Ist es möglich eine Methode zur erstmaligen Bestimmung der Schubspannung *in vivo* in wachsenden Kollateralen bei der Arteriogenese zu etablieren? (Originalarbeit 3.2.)
2. Können Leukozyten und Thrombozyten in Echtzeit *in vivo* bei deren Adhäsion und Extravasation in Kollateralgefäßen dargestellt und nachverfolgt werden? (Originalarbeit 3.3.)
3. Welchen Einfluss haben B- und T-Zellen auf der Arteriogenese (Originalarbeit 3.4.)
4. Hat die Behandlung von Mäusen mit RNase A, ähnlich wie bei der Arteriogenese, einen negativen Einfluss auf die Angiogenese? (Originalarbeit 3.5.)
5. Welchen Effekt hat der Knockout des „cold-inducible RNA-binding protein“ (CIRP) auf die Angiogenese? (Originalarbeit 3.6.)

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Übersicht der in der Habilitationsschrift zusammengefassten Originalarbeiten

Estimating hemodynamic shear stress in murine peripheral collateral arteries by two-photon line scanning.

**Lasch, M.**, Nekolla, K., Klemm, A. H., Buchheim, J. I., Pohl, U., Dietzel, S., & Deindl, E. (2019). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 453(1-2), 41-51.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3430-9>

Multiphoton Intravital Imaging for Monitoring Leukocyte Recruitment during Arteriogenesis in a Murine Hindlimb Model

**Lasch, M.**, Vladymyrov, M., van den Heuvel, D., Götz, P., Deindl, E., & Ishikawa-Ankerhold, H. (2021).

*JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (175), e62969.

DOI: 10.3791/62969

Rag1 Deficiency Impairs Arteriogenesis

Kumaraswami, K., Arnhold, C. Deindl, E., & **Lasch, M.** (2023).

*International Journal of Molecular Sciences*, 24, 12839.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241612839>

RNase A Treatment Interferes With Leukocyte Recruitment, Neutrophil Extracellular Trap Formation, and Angiogenesis in Ischemic Muscle Tissue

**Lasch, M.**, Kumaraswami, K., Nasiscionyte, S., Kircher, S., Van den Heuvel, D., Meister, S., Ishikawa-Ankerhold, H., & Deindl, E. (2020).

*Frontiers in Physiology*, 11, 576736.

DOI: 10.3389/fphys.2020.576736

Absence of Cold-Inducible RNA-Binding Protein (CIRP) Promotes Angiogenesis and Regeneration of Ischemic Tissue by Inducing M2-Like Macrophage Polarization.

Kübler, M., Beck, S., Fischer, S., Götz, P., Kumaraswami, K., Ishikawa-Ankerhold, H., **Lasch, M.**, & Deindl, E. (2021).

*Biomedicines*, 9(4), 395.

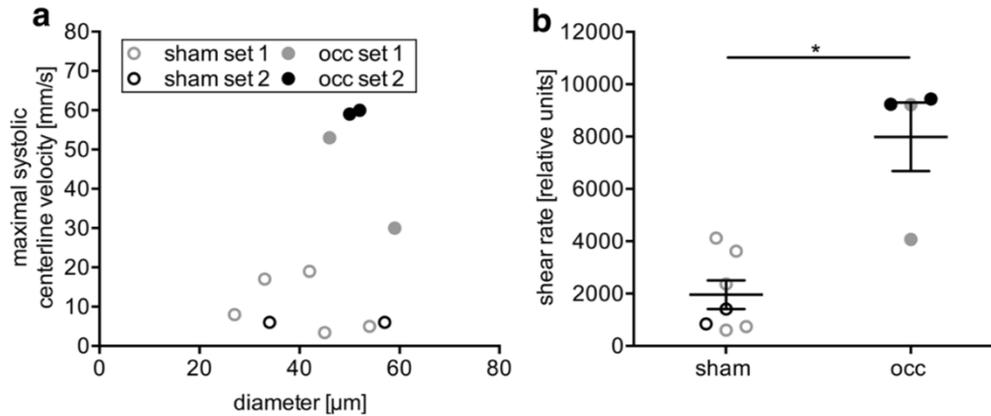
DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040395>

### 3.2. Bestimmung der Schubspannung *in vivo* bei der Arteriogenese

In vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen scheint es anhand theoretischer Überlegungen nahezuliegen, dass mechanische Reize eine wichtige Rolle spielen. So auch bei der Arteriogenese. Eine akut erhöhte Schubspannung in Kollateralgefäßen nach Verschluss einer Arterie stellt die Grundlage für die Initiierung des Gefäßwachstums dar [21]. Dabei ist es in der Vergangenheit aufgrund technischer Limitationen in der Messung der spezifischen Parameter zur Bestimmung der Schubspannung bzw. Schubrate nicht gelungen, diese direkt *in vivo* in Kollateralgefäßen, welche ein verschlossenes Gefäß umgeben, nachzuweisen. Ziel der hier zusammengefassten Forschungsarbeit war somit der erstmalige *in vivo* Nachweis und die Bestimmung der Schubspannung in peripheren Kollateralgefäßen.

Dabei wurde zunächst unter Verwendung eines weit verbreiteten Hinterbein-Models der Maus, wie zuvor schon beschrieben [22], die Arteriogenese unilateral durch Ligatur der Femoralarterie induziert, während die Gegenseite einer Scheinoperation unterzogen wurde. 24h nach der Femoralarterienligatur wurden die zu untersuchenden Kollateralgefäße unter Zuhilfenahme eines hochauflösenden Operationsmikroskops dargestellt und für eine anschließende Intravital-Mikroskopie freigelegt.

Zur Visualisierung der Kollateralgefäße wurde vor der Mikroskopie intravenös „fluorescein-isothiocyanat“ (FITC) zur Darstellung des Plasmas appliziert. Unter Verwendung der Zwei-Photonen-Intravitalmikroskopie mit einer hierdurch möglichen Zeilen-Scan-Methode konnten anschließend erstmals die notwendigen Parameter zur Bestimmung der Schubrate (Gefäßdurchmesser sowie Blutflussgeschwindigkeit (Abbildung 3 a)) live *in vivo* gemessen werden. In den Kollateralgefäßen um die operativ ligierte Femoralarterie ergab sich durchschnittlich eine Schubrate von  $7989 \pm 1308/s$ . In den Kollateralgefäßen um eine scheinoperierte, nicht ligierte Femoralarterie ergab sich eine durchschnittliche Schubrate von  $1959 \pm 545/s$ . Somit konnte 24h nach Ligatur im Vergleich zu den Kollateralgefäßen um die scheinoperierte Femoralarterie eine signifikante, 4-fach erhöhte Schubspannung nachgewiesen werden (Abbildung 3 b).



**Abbildung 3 (aus Lasch et al. [23]).** Bestimmung von Blutflussgeschwindigkeit, Gefäßdurchmesser und Schubrate. **(a)** Der Gefäßdurchmesser und die maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit an der Gefäßachse wurden mittels Intravitalmikroskopie und Zeilenscan bestimmt. **Graue und schwarze Punkte:** Werte der wachsenden Kollateralen 24 h nach Ligatur der Femoralarterie (okkludiert, occ); **Graue und Schwarze Kreise:** Werte der nicht-gewachsenen Kollateralen 24 h nach Scheinoperation (sham). **(b)** Darstellung der Schubrate in relativen Einheiten, berechnet aus den in **(a)** dargestellten Werten. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt,  $n \geq 4$  pro Gruppe. \* $p < 0,05$  (occ vs. sham) Mann-Whitney-Test.

Dabei stellt diese, erstmals in dem hier verwendeten Hinterbein-Modell der Maus nachgewiesene, erhöhte Schubrate die Grundlage für die Aktivierung der Gefäßwand und somit Initiierung der Rekrutierung und Extravasation von Leukozyten dar, welche anschließend durch die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren das Gefäßwachstum beeinflussen [18].

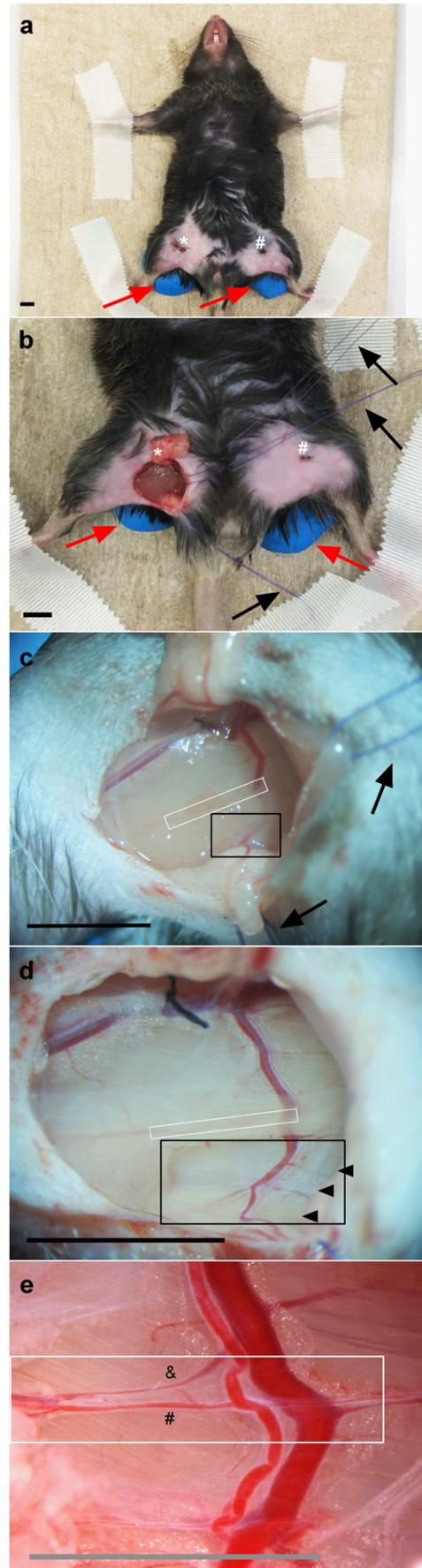
### 3.3. Darstellung der Leukozyten Rekrutierung *in vivo* bei der Arteriogenese

Nach Anstieg der Schubspannung in den präexistenten Kollateralgefäßen um eine verschlossene Arterie kommt es zu einer Freisetzung von extrazellulärer RNA, welche zusammen mit VEGF-A den VEGFR2/NRP-1 Rezeptorkomplex [24] aktiviert. Diese Aktivierung führt zu einer aktiven Freisetzung von von-Willebrand-Faktor aus Weibel-Palade-Bodies nach intraluminal [18]. Durch den freigesetzten von-Willebrand-Faktor kommt es zu einer Aktivierung von Thrombozyten, welche ihrerseits neutrophile Granulozyten aktivieren/rekrutieren und dadurch deren Extravasation initiieren. Nach der Extravasation aktivieren die neutrophilen Granulozyten perivaskuläre Mastzellen, welche nach Degranulation weitere Leukozyten in den perivaskulären Raum rekrutieren [18, 19]. Zur Darstellung dieser Prozesse werden im Allgemeinen immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten durchgeführt, oder fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie angewendet. Durch histologische Auswertungen ist insbesondere eine genaue topographische Darstellung der zu untersuchenden Zellen möglich, während durch Durchflusszytometrie in kurzer Zeit große Mengen an Zellen gezählt, charakterisiert und insb. quantitativ ausgewertet werden können.

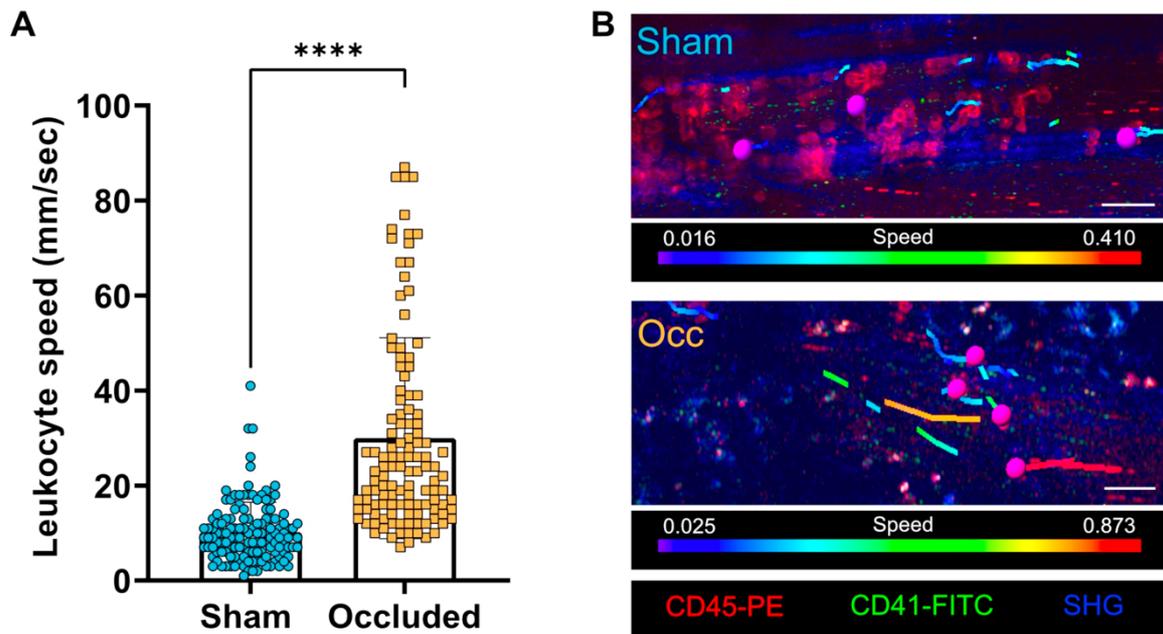
Bei beiden genannten Methoden ist es allerdings nicht möglich, eine dynamische Darstellung der Zellen *in vivo* während des Prozesses der Rekrutierung oder der Extravasation zu erhalten. Ziel dieser Studie war demnach eine visuelle *in vivo* Darstellung von Leukozyten während deren Rekrutierung zu ermöglichen.

Hierfür wurden erneut unter Verwendung des Hinterbein-Mausmodels nach unilateraler Ligatur der Femoralarterie [22] die präexistenten Kollateralgefäße freigelegt und für eine Multiphotonen-Intravitalmikroskopie präpariert (Abbildung 4).

**Abbildung 4 (aus Lasch et al. [23]).** Arterienpräparation als Vorbereitung für die Intravital-Mikroskopie. Stadien der Präparation: **(a)** Lagerung und Fixierung der Maus. Es sind sowohl der ligierte (\*) als auch der scheinoperierte (#) Hinterlauf der Maus dargestellt. Unter den Oberschenkeln wurde Knetmasse (rote Pfeile) platziert, um eine horizontale Lage des Adduktoren Muskels und der Kollateralgefäße zu erreichen. **(b)** Präparation und Aufspannung einer Hauttasche mit Hilfe von Nähten (schwarze Pfeile). **(c, d, e)** Schrittweise Freilegung der Kollateralgefäße. Subkutanes Fett und oberflächliches Adduktormuskelgewebe verdecken teilweise die Kollateralen (c, weißes Rechteck) und die A. profunda (c, schwarzes Rechteck). Nach Entfernung von Fett und oberflächlichen Muskelfasern (d, schwarzes Rechteck) ist die A. profunda deutlich sichtbar. (e) Nach weiterer Gewebeentfernung sind letztendlich auch eine Kollateralarterie (#) und die zugehörige Kollateralvene (&) klar sichtbar (weißes Rechteck). Schwarze Maßstabsbalken: 5 mm; grauer Maßstabsbalken: 2,5 mm.



Nach Anlage eines peripheren Venenkatheters konnten nun selektive Antikörper zur Darstellung von Leukozyten oder auch Thrombozyten intravenös appliziert werden. Unter Verwendung einer speziellen Software, welche ein „aus dem Fokus“ gleiten des zu untersuchendem Kollateralgefäßes verhindert, war es nun möglich dynamisch die zuvor markierten Leukozyten in den Kollateralgefäßen über einen längeren Zeitraum darzustellen und zu analysieren, sowie die Geschwindigkeit dieser Leukozyten zu messen (Abbildung 5 A, B).



**Abbildung 5 (aus Lasch et al. [25]). (A)** Gemessene Leukozytengeschwindigkeiten in Kollateralarterien nach Scheinoperation der Femoralarterie (Sham) und nach Ligatur der Femoralarterie (Occluded). **(B)** Repräsentative Bilder zeigen die verfolgten Zellen (magenta), wobei die Spuren farblich gekennzeichnet sind. Der Farbcodebalken steht für die Zellgeschwindigkeit, wobei die langsameren Zellen durch blaue Markierungen und die schnelleren Zellen durch rote Markierungen dargestellt sind. Leukozyten wurden mit injizierten CD45-PE-Antikörpern (rot), Thrombozyten mit injizierten CD41-FITC-Antikörpern (grün) und das Kollagen Typ 1 mit dem SHG (blau) markiert. Die dargestellten Ergebnisse in (A) wurden aus drei einzelnen Experimenten gewonnen. Maßstabsbalken = 20 µm. Für eine dynamische Darstellung der Abbildung B siehe Video 3 und Video 4 aus der Originalarbeit [25].

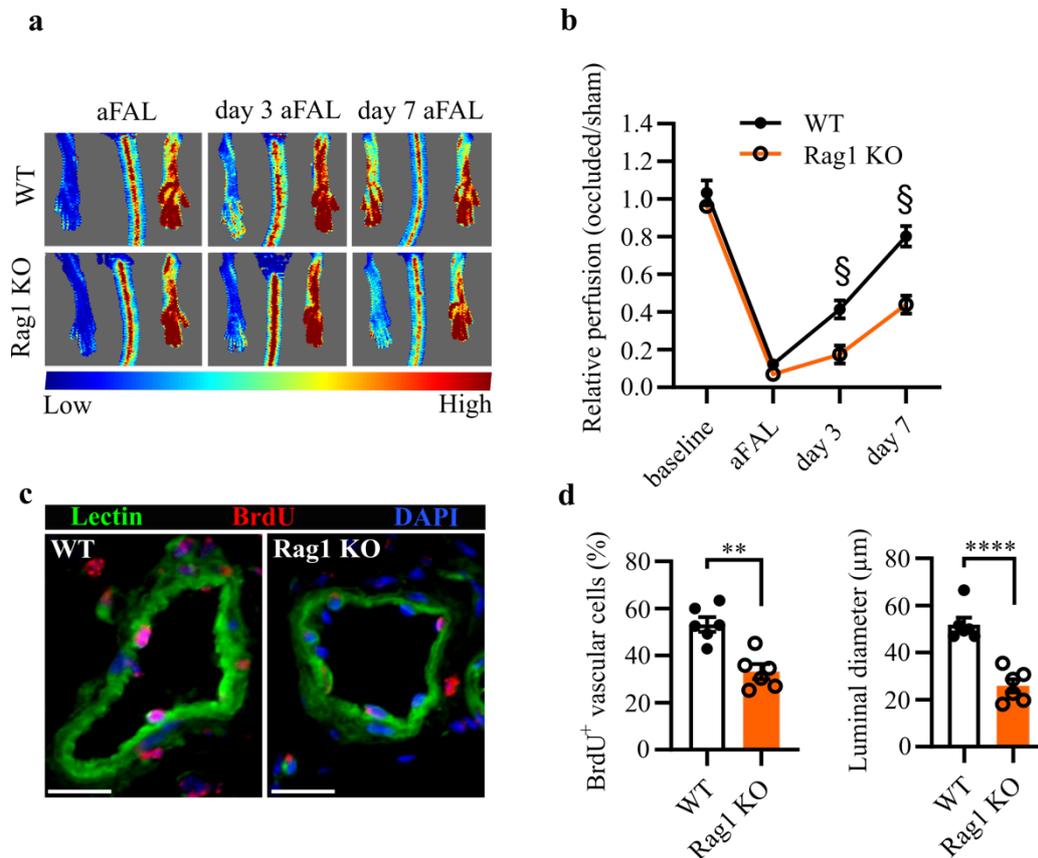
Abkürzungen: Occ = okkludiert; PE = Phycoerythrin; FITC = Fluoresceinisothiocyanat; SHG = second harmonic generation.

Somit stellt diese neu etablierte Methode für das Hinterbein-Mausmodell eine besonders wertvolle Ergänzung zu den bereits gängigen Analyseverfahren dar, um relevante dynamische Informationen zu generieren.

### 3.4. Die Rolle von B- und T-Zellen bei der Arteriogenese

Neben der Etablierung und Validierung neuer Analysemethoden zum besseren *Verständnis* des Prozesses der Arteriogenese sind für eine weitere Aufklärung regulatorische Grundlagenstudien notwendig. Während hierbei die Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Arteriogenese weitgehend aufgeklärt ist, bleibt die Rolle des adaptiven Immunsystems weitgehend ungeklärt [26, 27].

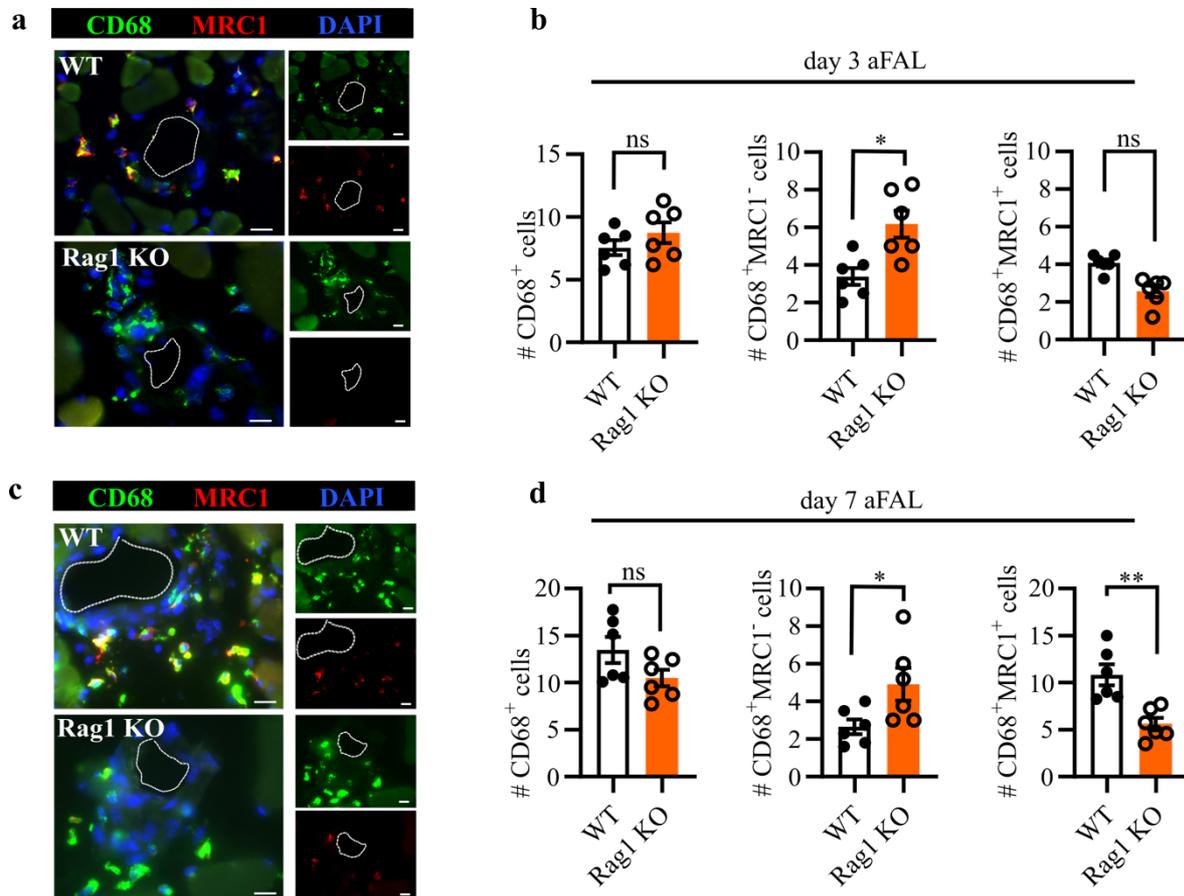
Um die Rolle der B- und T-Zellen bei der Arteriogenese näher untersuchen zu können, wurden „recombination activating gene-1“ (Rag1) Knockout Mäuse verwendet, welche weder B- noch T-Zellen besitzen. Als Vergleichsgruppe dienten Wildtyp Mäuse. Die Arteriogenese wurde jeweils durch unilaterale Ligatur der Femoralarterie induziert [22] (Abbildung 2 A, B). Unter Verwendung einer Laser-Doppler-Imaging (LDI) Methode konnten nun zu verschiedenen Zeitpunkten nichtinvasiv die Perfusionswiederherstellung des ligierten Hinterbeins im Vergleich zur scheinoperierten Seite analysiert werden. Dabei ergab sich an Tag 3 und Tag 7 nach Ligatur eine signifikant reduzierte Perfusionswiederherstellung der Rag1 Knockout Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 6 a, b). Zur genaueren Analyse und um auszuschließen, dass die signifikant schlechtere Perfusionswiederherstellung im LDI in der Rag1 Knockout Gruppe nicht durch z.B. eine gestörte/veränderte Vasodilatation bedingt ist wurden die Mäuse mit einem Proliferationsmarker (Bromdesoxyuridin (BrdU)) behandelt, welcher im Rahmen der Zellteilung von der sich teilenden Zelle in deren DNA integriert wird und anschließend mittels Immunfluoreszenzfärbung angefärbt werden kann. 7 Tage nach Ligatur ergab sich hier äquivalent zu den LDI Ergebnissen ein signifikant verringerter Prozentsatz an proliferierenden Gefäßzellen in der Rag1 Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 6 c, d). Darüber hinaus zeigte die Rag1 Gruppe ebenso einen geringeren Kollateralgefäßdurchmesser 7 Tage nach Femoralarterienligatur (Abbildung 6 d).



**Abbildung 6 (aus Kumaraswami et al.[28]).** Verschlechterte Arteriogenese in Rag1 KO Mäusen. **(a)** Repräsentative Laser-Doppler-Flussbilder von Wildtyp- (WT, obere Reihe) oder Rag1 Knockout (Rag1 KO, untere Reihe) Mäusen direkt nach Femoralarterienligatur (FAL, links), Tag 3 (mittig) oder Tag 7 (rechts) nach FAL. Die Flusskala zeigt einen Anstieg der Perfusion von blau (niedrig) nach rot (hoch) an. **(b)** Relative Perfusion von WT- oder Rag1 KO Mäusen vor Ligatur (baseline), direkt nach Ligatur (aFAL), an Tag 3 oder Tag 7 nach Femoralarterienligatur. n=6, Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt. §= p<0,0001 mittels zweifaktorieller ANOVA Varianzanalyse mit Bonferroni Korrektur. **(c)** Epifluoreszenzbilder der Adduktorenmuskeln von WT- und Rag1-KO-Mäusen an Tag 7 aFAL, gefärbt für BrdU (Proliferationsmarker), Lektin (Gefäßvisualisierung) und DAPI (Zellkerne). Proliferierende Gefäßzellen wurden als BrdU<sup>+</sup> kernhaltige Zellen identifiziert, die sich in der Gefäßwand befinden. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m. **(d)** Balkendiagramme zeigen die Anzahl der BrdU<sup>+</sup>-Gefäßzellen (links) und den Gefäßdurchmesser der Kollateralarterien (rechts). Jeder Punkt stellt den Mittelwert von 6-10 Kollateralarterienabschnitten pro Maus dar. n = 6 Mäuse, Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001 analysiert durch ungepaarten Student's t-test.

Es ist bekannt, dass Makrophagen maßgeblich an der Regulierung von Entzündungen und Regeneration beteiligt sind [29], zusätzlich ist sowohl die räumliche, als auch die zeitliche Analyse von perivaskulären Makrophagen im Rahmen der Arteriogenese von entscheidender Bedeutung [30]. Daher wurde 3 und 7 Tage nach Induktion der Arteriogenese sowohl quantitativ als auch qualitativ (Makrophagenpolarisation) eine Analyse der perivaskulären Makrophagen durchgeführt. Hier ergab sich in der Rag1 Gruppe sowohl an Tag 3, als auch an Tag 7 kein Unterschied in der Anzahl der Gesamtmakrophagen (CD68<sup>+</sup> Zellen, Abbildung 7 a-d). Die Analyse der Makrophagenpolarisation zeigte hingegen an Tag 3 und Tag 7 nach Femoralarterienligatur eine signifikant erhöhte Anzahl an M1-ähnlich polarisierten, inflammatorischen Makrophagen (CD68<sup>+</sup>MRC-1<sup>-</sup> Zellen, Abbildung 7 b, d). Die Anzahl

an regenerativen, M2-ähnlich polarisierten Makrophagen (CD68<sup>+</sup>MRC-1<sup>+</sup> Zellen) war in der Rag1 Knockout Gruppe an Tag 7 nach Ligatur signifikant verringert (Abbildung 7 d).



**Abbildung 7 (aus Kumaraswami et al.[28]).** Perivaskuläre Makrophagenpolarisation in Rag1 KO Mäusen. Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von perivaskulären Makrophagen wachsender Kollateralarterien in WT- und Rag1 KO-Mäusen 3 Tage (a) oder 7 Tage (c) nach Femoralarterienligatur. Das arterielle Lumen ist durch eine weiße gestrichelte Linie gekennzeichnet. Maßstabsbalken 20 µm. Die Balkendiagramme (b,d) zeigen die Anzahl der totalen perivaskulären Makrophagen (CD68<sup>+</sup> Zellen), den M1-ähnlich polarisierten Makrophagen (CD68<sup>+</sup>MRC1<sup>-</sup> Zellen) oder den M2-ähnlich polarisierten Makrophagen (CD68<sup>+</sup>MRC1<sup>+</sup> Zellen) 3 Tage (b) oder 7 Tage (d) nach Femoralarterienligatur. Die y-Achse in (b,d) zeigt die absolute Anzahl der perivaskulären Makrophagen pro Kollateralarterie. Die Daten werden als Mittelwerte ± S.E.M. dargestellt. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus 6-10 Kollateralarterienanschnitten pro Maus dar. n = 6. \*p<0,05, \*\*p<0,01, ns = nicht signifikant. Analyse mittels ungepaartem Student's t-test.

Resümierend konnten wir eine signifikante Beteiligung des adaptiven Immunsystems, im speziellen der B- und T- Zellen, bei der Arteriogenese nachweisen. Unter Verwendung von Rag1 Knockout Mäusen, welchen sowohl B- als auch T- Zellen fehlen, zeigte sich eine signifikant schlechtere Arteriogenese. Darüber hinaus war es uns möglich einen Einfluss dieser adaptiven Immunzellen auf die, für die Arteriogenese wichtige, Makrophagenpolarisation nachzuweisen. Obwohl unsere Studie eine systematische Analyse der Arteriogenese in Rag1-KO-Mäusen liefert, bleiben

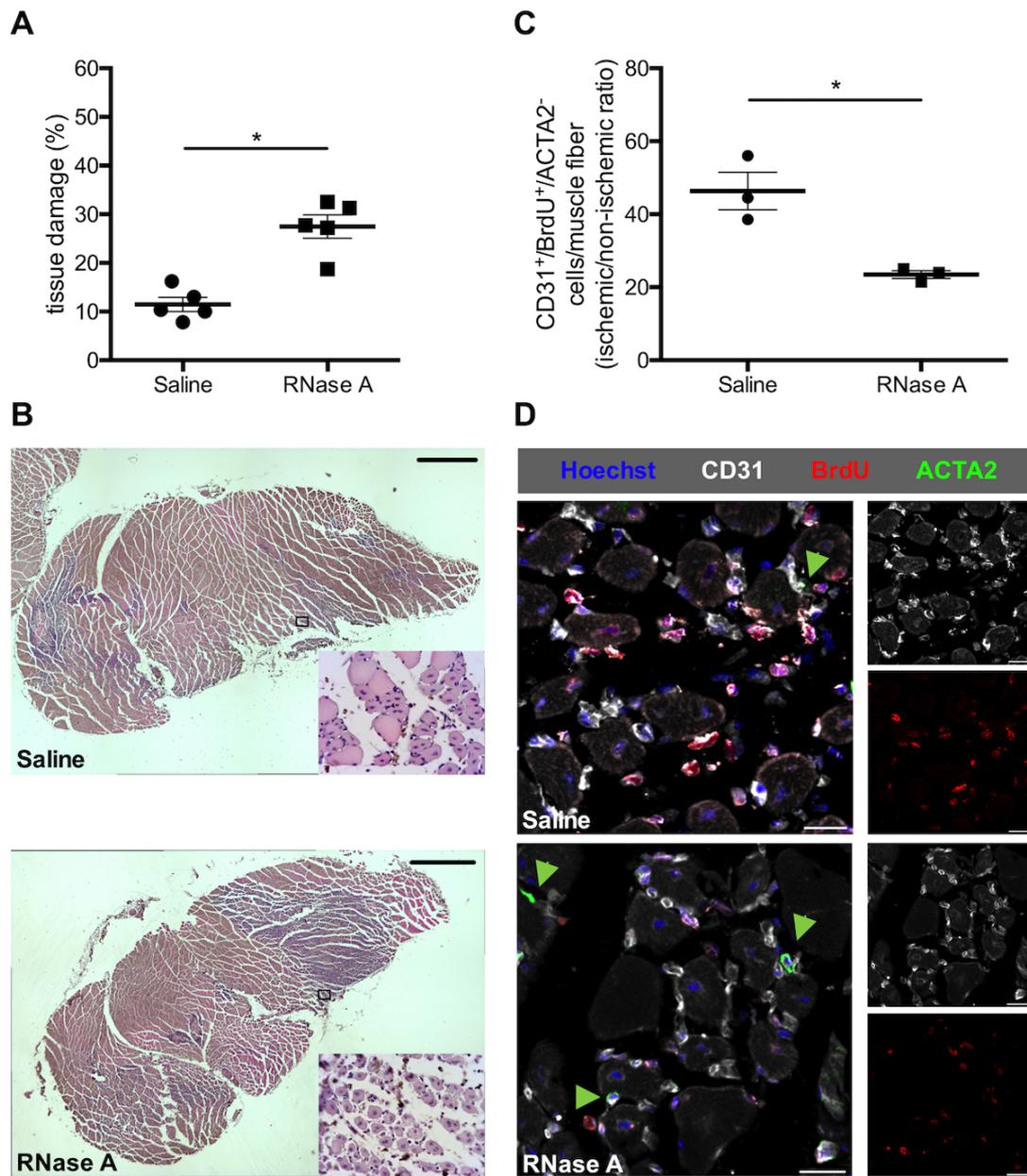
Einschränkungen insbesondere im Hinblick auf mechanistische Erkenntnisse bestehen. Daher sind weitere Untersuchungen erforderlich, um den detaillierten Mechanismus zu entschlüsseln, wie Lymphozyten den Prozess der Arteriogenese und im Detail die Makrophagenpolarisierung beeinflussen. Darüber hinaus ist es wichtig, die genaue Rolle der B- und T-Zellen in diesem Prozess zu verstehen. Insgesamt können die, in der vorliegenden Studie gewonnenen, Daten allerdings die Grundlage für künftige Studien bilden, in denen die Funktion einzelner Untergruppen von Lymphozyten im Prozess der Arteriogenese im Detail untersucht wird.

### **3.5. Der Effekt von RNase A Behandlung auf die Angiogenese**

Bereits durchgeführte Forschungsarbeiten konnten bei der Arteriogenese, dem Wachstum natürlicher Bypässe aus präexistenten Kollateralgefäßen, eine große Relevanz der, durch die Endothelzellen aktiv freigesetzten, extrazellulären RNA nachweisen [18]. Dabei ist die Relevanz dieser extrazellulären RNA bzw. der Effekt einer Behandlung mittels RNase A, welche extrazellulär vorhandene RNA umgehend degradiert, für die Angiogenese ungeklärt.

Der Auslöser der Angiogenese ist im Gegensatz zur Arteriogenese eine Unterversorgung von Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen, was in einer Ischämie resultiert. Bei der Ischämie wird vor allem die Hypoxie als Stimulus der Angiogenese beschrieben, wobei es auch Anhaltspunkte gibt, dass die erhöhte Schubspannung ein Trigger sein könnte [4]. Im Allgemeinen dient die Angiogenese dazu, den Sauerstoff- und Nährstoffbedarf des Gewebes unter verschiedenen (patho-)physiologischen Bedingungen sicherzustellen [31, 32]. Darüber hinaus dient die Angiogenese dazu in ischämisch geschädigtem Gewebe den Abtransport von untergegangenen Zellen zu erleichtern [33].

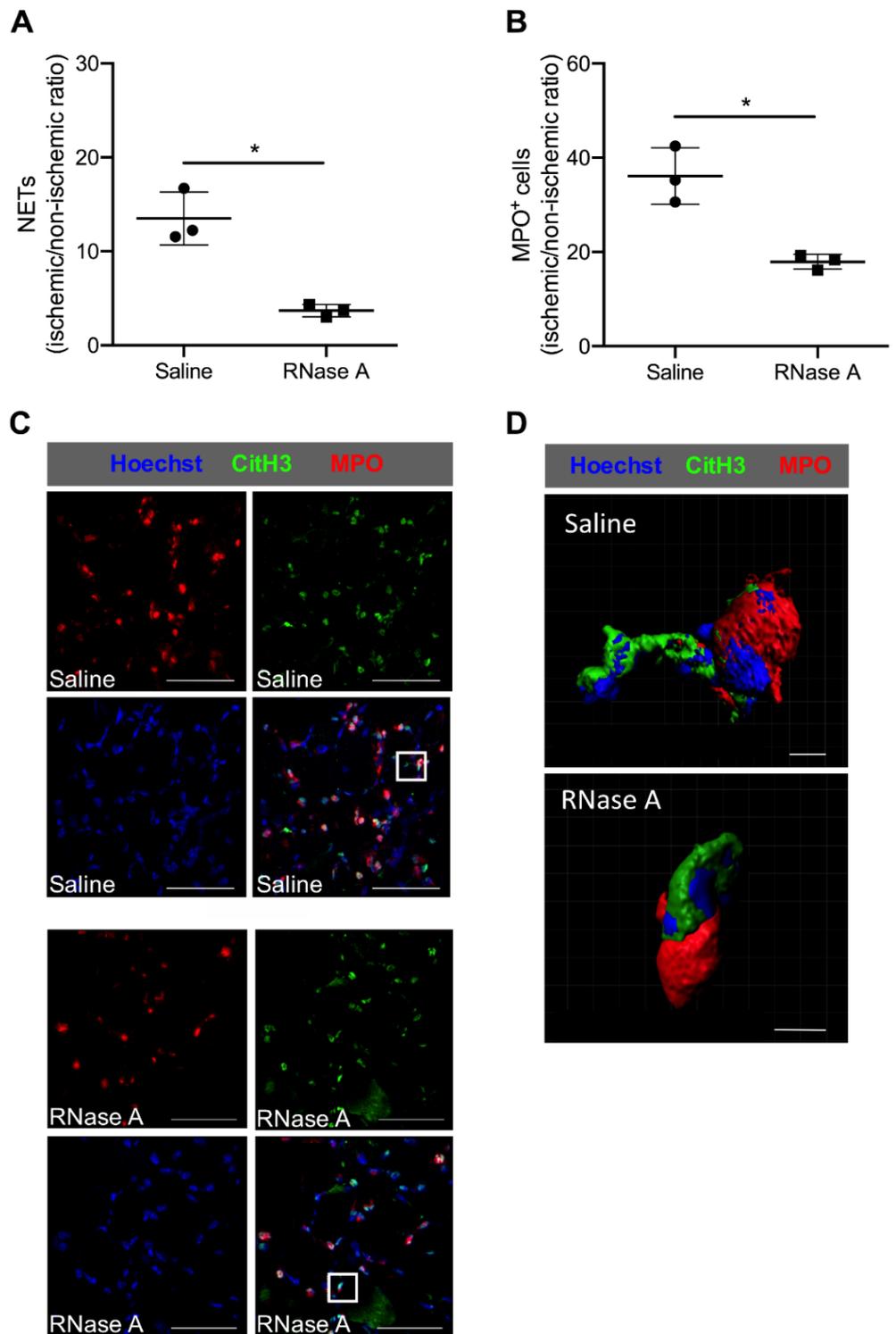
Zur Untersuchung eines möglichen Effekts einer RNase A Behandlung auf die Angiogenese wurden Mäuse jeden zweiten Tag intravenös mit RNase A behandelt. Unter Verwendung des bereits erläuterten Hinterbein-Mausmodells wurde die Angiogenese im Unterschenkel mittels unilateraler Ligatur der Femoralarterie induziert [22] (siehe Abbildung 2 A, B). Anschließend wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Angiogenese histologische Analysen durchgeführt. Dabei zeigte sich 7 Tage nach Induktion der Angiogenese in der RNase A behandelten Gruppe ein signifikant vergrößertes Muskelareal mit Gewebeschädigung (Abbildung 8 A, B). Gleichzeitig zeigte die RNase A behandelte Gruppe ein signifikant reduziertes Kapillare/Muskelfaser Verhältnis (ischämischer Muskel versus nicht-ischämischer Muskel), als Zeichen einer signifikant reduzierten Angiogenese (Abbildung 8 C, D).



**Abbildung 8 (aus Lasch et al. [20]).** Die Behandlung mit RNase A führt zu einer verringerten Angiogenese und einer erhöhten Gewebeschädigung. **(A)** Das Diagramm zeigt den Prozentsatz der Gewebeschäden im Gastrocnemius-Muskel von Mäusen, die mit RNase A oder Kochsalzlösung (Kontrollgruppe) behandelt wurden, 7 Tage nach Femoralarterienligatur (FAL). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt,  $n = 5$  pro Gruppe, wobei die gesamte Querschnittsfläche des Gastrocnemius-Muskels wurde pro Maus analysiert.  $*p < 0,05$  (RNase A vs. Kochsalzlösung behandelte Gruppe) ungepaarter Student's t-test. **(B)** Repräsentative Bilder der analysierten H&E gefärbten Gastrocnemius-Muskeln von mit Kochsalzlösung (oberes Bild) oder RNase A (unteres Bild) behandelten Mäusen 7 Tage nach FAL. Nach der Behandlung mit RNase A ist eine deutliche Zunahme der Gewebeschädigung zu erkennen, z.B. anhand von Skelettmuskelzellen mit zentralisierten Zellkernen (kleine Vergrößerungen rechts unten). Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m. **(C)** Das Diagramm zeigt die proliferierenden (CD31<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>/ACTA2<sup>-</sup>) Endothelzellen pro Muskelfaser (ischämisches zu nicht-ischämisches Gewebeverhältnis) im M. gastrocnemius von mit RNase A oder Kochsalzlösung behandelten Mäusen 7 Tage nach FAL. Die Daten werden erneut als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt,  $n = 3$  pro Gruppe, 10 Querschnittsflächen (je 450  $\mu$ m  $\times$  450  $\mu$ m) des Gastrocnemius-Muskels wurden pro Maus und Bein analysiert.  $*p < 0,05$  (RNase A vs. Kochsalzlösung behandelte Gruppe) ungepaarter Student's t-test. **(D)** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von analysiertem Gastrocnemius-Muskelgewebe nach Kochsalzlösungs- (oberes Bild) oder RNase A-Behandlung (unteres Bild) 7 Tage nach FAL. Endothelzellen wurden mit anti-CD31 (weiß), mit anti-BrdU 546 (rot, als Proliferationsmarker) und dem DNA-Marker Hoechst (blau) markiert. Perizyten wurden zusätzlich mit Anti-ACTA2 (grün und durch grüne Pfeilspitzen gekennzeichnet) markiert. Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m.

Bei Betrachtung der, für eine regelhaft funktionierende Angiogenese relevanten, Immunzellen 7 Tage nach Induktion der Angiogenese ergab sich ein ähnliches Bild. Hier waren jeweils das Verhältnis zwischen ischämischen und nicht ischämischen Muskel von Leukozyten (CD45-positive Zellen), von neutrophilen Granulozyten (Ly6G-positive Zellen) und von Makrophagen (CD68-positive Zellen) unter RNase A Behandlung signifikant reduziert. Bei genauerer Differenzierung der Makrophagen in inflammatorische M1-ähnliche (CD68<sup>+</sup>MRC1<sup>-</sup>) und regenerative M2-ähnliche (CD68<sup>+</sup>MRC1<sup>+</sup>) Makrophagen zeigte sich eine prozentual signifikant reduzierte Anzahl an M1-ähnlichen Makrophagen. Der Anteil M2-ähnlicher Makrophagen in der RNase A behandelten Mausgruppe war prozentual signifikant erhöht. Interessanterweise wurde kürzlich in einer anderen Studie gezeigt, dass nicht nur Leukozyten, wie neutrophile Granulozyten oder Makrophagen, allein für die Angiogenese relevant sind, sondern auch die Ausbildung von „neutrophil extracellular traps“ (NETs), welche die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* fördern können [34]. In der Analyse der neutrophilen Granulozyten und dieser NETs zwei Tage nach Induktion der Angiogenese ergab sich erneut ein signifikant reduziertes Verhältnis (ischämischer versus nicht-ischämischer Muskel) sowohl der neutrophilen Granulozyten, als auch der NETs in der RNase A behandelnden Gruppe im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Abbildung 9 A, B). Die signifikante Reduktion der NETs in der RNase A behandelten Gruppe scheint jedoch eine direkte Folge der ebenfalls signifikant reduzierten Gesamtanzahl an neutrophilen Granulozyten (Abbildung 9 B) zu sein. Da bereits ein fördernder Effekt von NETs auf die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden konnte [34] und diese signifikant in den RNase A behandelten Mäusen reduziert sind, wäre hierdurch auch eine weitere Ursache der signifikant reduzierten Angiogenese in der RNase A Behandlungsgruppe denkbar.

**Abbildung 9 (aus Lasch et al. [20]).** RNase A Behandlung führt zu einer verringerten Anzahl von NETs. **(A, B)** Die Diagramme zeigen das Verhältnis (ischämisches vs. nicht ischämisches Gewebe) der NETs **(A)** oder der gesamten MPO<sup>+</sup> (Myeloperoxidase)-Zellen als Marker für neutrophile Granulozyten **(B)** von RNase A oder Kochsalzlösung behandelten Mäusen 2 Tage nach FAL. Die Daten werden als Mittelwerte ± S.E.M. dargestellt, n = 3 pro Gruppe, 10 Querschnittsflächen (jeweils 450 µm × 450 µm) des Gastrocnemius-Muskels wurden pro Maus und Bein analysiert. \*p < 0,05 (RNase A vs. mit Kochsalzlösung behandelte Gruppe) ungepaarter Student's t-test. **(C)** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder des untersuchten Gastrocnemius-Muskelgewebes von mit Kochsalzlösung (oberes Bild) oder RNase A (unteres Bild) behandelten Mäusen 2 Tage nach FAL. Die NETs wurden mit Anti-MPO (Myeloperoxidase, Marker für neutrophile Granulozyten, rot) und Anti-CitH3 (citruiniertes Histon H3, grün) sowie Hoechst (DNA-Marker, blau) angefärbt. Maßstabsbalken = 50 µm. **(D)** Repräsentative Immunfluoreszenz-3D-Rekonstruktion eines neutrophilen Granulozyten mit NET-Bildung [Vergrößerung des weißen Rechtecks in **(C)**] von mit Kochsalzlösung (oberes Bild) oder RNase A (unteres Bild) behandelten Mäusen 2 Tage nach FAL. Maßstabsbalken = 4 µm.



Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die RNase A Behandlung nicht nur die Arteriogenese, sondern auch die Angiogenese negativ beeinflusst. Dies könnte möglicherweise, ähnlich wie bei der Arteriogenese [18], durch eine reduzierte NRP-1/VEGFR2-vermittelte Zellaktivierung verursacht sein [35]. Der negative Effekt der RNase A Behandlung auf die Angiogenese könnte jedoch auch auf die verminderte Leukozytenrekrutierung und die damit verbundene reduzierte VEGF-A-Versorgung zurückzuführen sein. Da RNase A keine Anzeichen von Toxizität, aber eine hohe ribonukleolytische Aktivität aufweist, könnte geschlussfolgert werden, dass RNase A die Angiogenese durch den direkten Abbau von extrazellulärer RNA beeinflusst. Letztendlich weisen diese Daten auf eine noch nicht bekannte Rolle der extrazelluläre RNA bei der Angiogenese hin. Es sind jedoch weitere Studien erforderlich, um diese Annahme sowie die vermuteten molekularen Mechanismen zu bestätigen.

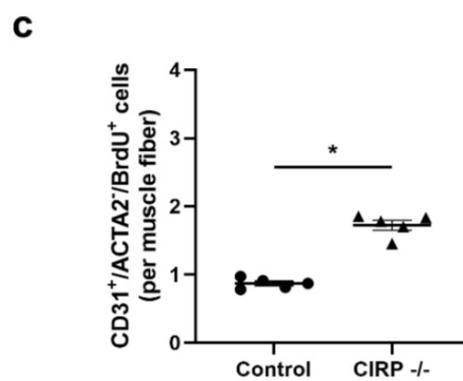
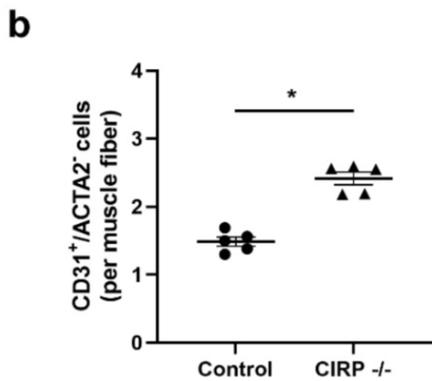
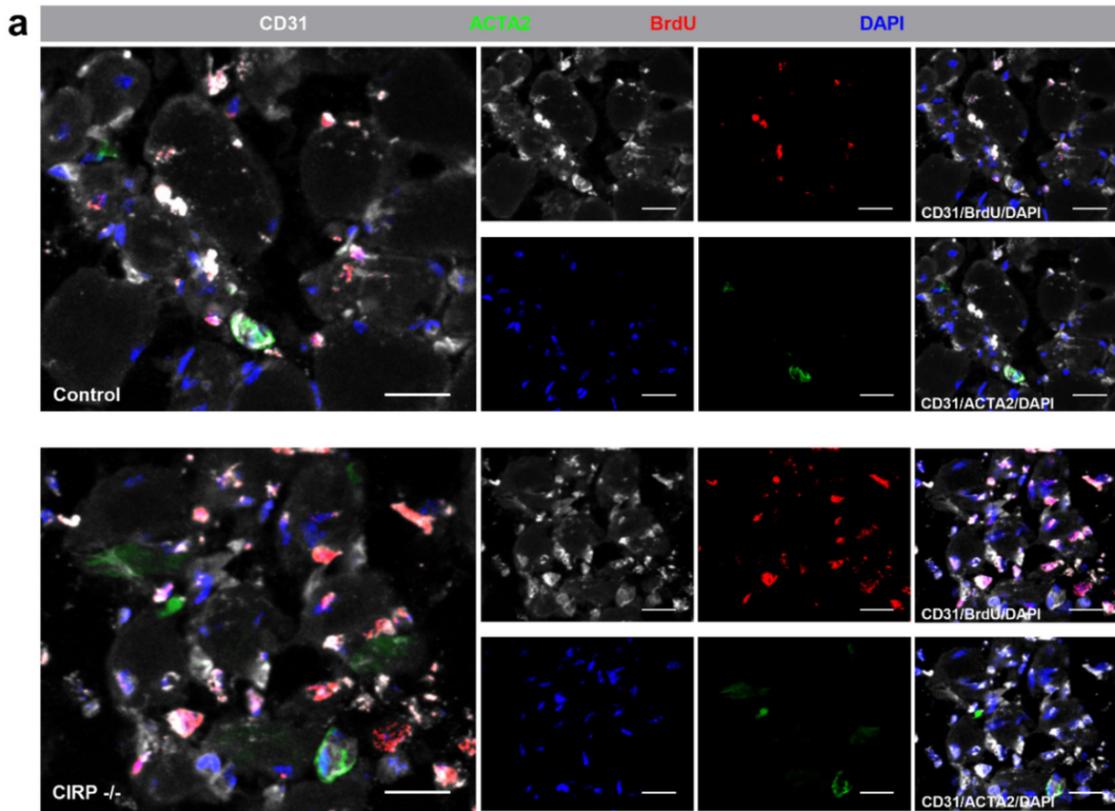
### **3.6. Die Rolle von “cold-inducible RNA-binding protein” (CIRP) bei der Angiogenese**

Nachdem in der zuvor beschriebenen Forschungsarbeit ein negativer, mutmaßlich durch die Degradierung von extrazellulärer RNA bedingter, Effekt der RNase A Behandlung bei der Angiogenese nachgewiesen werden konnte, bleibt die Frage zu klären, ob weitere Substanzen oder Proteine die Bioverfügbarkeit von extrazellulärer RNA beeinflussen können. Ein mögliches Protein, welches die Bioverfügbarkeit von extrazellulärer RNA beeinflussen könnte, ist das „cold-inducible RNA-binding protein“ (CIRP). Das CIRP fungiert intrazellulär lokalisiert (iCIRP) als Regulator der Translation bestimmter mRNAs [36, 37]. Unter hypoxischen und mild hypothermen Bedingungen wird CIRP vermehrt exprimiert und wirkt bei zunehmender Freisetzung extrazellulär (eCIRP) als Entzündungsmediator [38].

Ein zusätzlicher Effekt von eCIRP durch Bindung von extrazellulärer RNA und somit Beeinflussung von deren Bioverfügbarkeit wäre darüber hinaus denkbar. Die Relevanz des CIRP bei der Angiogenese ist jedoch nicht hinreichend untersucht und war daher, auch im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung der Bioverfügbarkeit von extrazellulärer RNA, Ziel dieser Studie.

Zunächst wurde vergleichbar zur Forschungsarbeit über die Relevanz einer RNase A Behandlung bei der Angiogenese diese durch unilaterale Ligatur der Femoralarterie bei Verwendung des genannten Hinterbein-Mausmodells induziert [22]. Jedoch wurden diesmal, neben einer Kontrollgruppe aus Wildtyp-Geschwistermäusen (Control), CIRP Knockout-Mäuse (CIRP  $-/-$ ) verwendet.

Zur Analyse der Kapillarsprossung wurde 7 Tage nach Induktion der Angiogenese das Kapillare/Muskelfaser Verhältnis bestimmt. Anders als unter RNase A Behandlung ergab sich unter dem Knockout von CIRP ein signifikant erhöhtes Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern im Vergleich zur Kontrollgruppe, was auf eine gesteigerte Angiogenese in CIRP Knockout Mäusen hinweist (Abbildung 10).



**Abbildung 10 (aus Kübler et al. [39]).** CIRP Knockout fördert die Angiogenese.

Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von ischämischen Muskelschnitten des M. gastrocnemius von CIRP-Wildtyp-Kontrollmäusen (Control, oben) und CIRP -/- Mäusen (unten) 7 Tage nach FAL. Kleinere Bilder von Einzelkanälen und kombinierten Kanälen (CD31/BrdU/DAPI und CD31/ACTA2/DAPI), große Bilder mit allen kombinierten Kanälen von Endothelzellen (Anti-CD31, weiß), proliferierenden Zellen (Anti-BrdU, rot), Perizyten (Anti-ACTA2 (Alpha-Aktin-2), grün) und Nukleinsäure (DAPI, blau). Maßstabbalken 20 µm. **(b)** Die Diagramme zeigen CD31<sup>+</sup>ACTA2<sup>-</sup> (Endothelzellen) und **(c)** CD31<sup>+</sup>ACTA2<sup>+</sup>BrdU<sup>+</sup> (proliferierende Endothelzellen) pro Muskelfaser der ischämischen Gastrocnemius-Muskeln von CIRP -/- und Kontrollmäusen 7 Tage nach FAL. Die Daten werden als Mittelwerte ± S.E.M. dargestellt, n = 5 pro Gruppe. \* p < 0,05 (CIRP -/- vs. Control) ungepaarter Student's t-test.

Gleichzeitig ergab sich bei den CIRP -/- Tieren ein signifikant reduzierter Gewebeschaden im Muskel 7 Tage nach Angiogenese-Induktion.

Die CD45-positiven Zellen (Leukozyten) waren 7 Tage nach Induktion der Angiogenese in den CIRP -/- Tieren signifikant reduziert, bei jedoch identischer Anzahl an Makrophagen in beiden Gruppen. Der prozentuale Anteil an inflammatorischen M1-ähnlichen Makrophagen war in den CIRP -/- Mäusen signifikant reduziert, während der prozentuale Anteil an regenerativen M2-ähnlichen Makrophagen signifikant erhöht war.

Unter Berücksichtigung der Makrophagen-Daten aus der zuvor vorgestellten Originalarbeit unter 3.3., zeigt sich eine identische Polarisationsgewichtung mit unterschiedlichem Ergebnis. Bei beiden Gruppen (RNase A- sowie CIRP-Knockout Gruppe) zeigen sich 7 Tage nach Ischämieinduktion prozentual vermehrt M2-ähnlich polarisierte Makrophagen. Während die CIRP-Knockout Gruppe jedoch eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbesserte Angiogenese zeigte, war die Angiogenese in der RNase A Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verschlechtert. Somit scheinen die vermehrten M2-ähnlichen Makrophagen im Falle der CIRP Knockoutgruppe die Angiogenese positiv zu beeinflussen, während bei der RNase A Gruppe die vermehrten M2-ähnlichen Makrophagen zu keiner verbesserten Angiogenese führen. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei Makrophagen um eine sehr plastische Zellpopulation handelt und die M1- und M2- ähnliche Polarisation lediglich einen Ausschnitt aus dem breiten Spektrum der Polarisation darstellt [40]. In der RNase A behandelten Gruppe konnten fast ausschließlich (>80%) M2-ähnlich polarisierte Makrophagen nachgewiesen werden, während das Verhältnis zwischen M1-ähnlich- (ca. 45%) und M2-ähnlich (ca 55%) polarisierten Makrophagen in der CIRP Knockout Gruppe deutlich ausgeglichener war. Darüber hinaus zeigte sich in der CIRP-Knockout Gruppe kein Unterschied in der Gesamtmakrophagenzahl, währenddessen die Gesamtmakrophagenzahl in der RNase A Gruppe signifikant reduziert war. Dies lässt darauf schließen, dass nicht nur die Polarisation der Makrophagen und deren Polarisationsverhältnis, sondern auch die Anzahl einen entscheidenden Einfluss auf die Angiogenese hat. Zuletzt handelt es sich bei den hier vorgestellten Daten um statische Analysen zu einem definierten Zeitpunkt (in diesem Fall 7 Tage nach Ischämieinduktion), so dass keinerlei Aussage über die zuvor vorherrschende Polarisationsgewichtung während des dynamischen Prozesses der Angiogenese gemacht werden kann.

Bei der Analyse der neutrophilen Granulozyten zwei Tage nach Angiogenese-Induktion, als auch die Analyse von NETs zeigte ebenfalls eine reduzierte Anzahl in Knockout Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren. Im Gegensatz zu der RNase A Behandlungsgruppe, bei der die reduzierte NETs Anzahl eine Folge der ebenfalls signifikant reduzierten Anzahl an neutrophilen Granulozyten zu sein scheint, war das Verhältnis von NETs pro neutrophilen Granulozyten in der CIRP -/- Gruppe signifikant reduziert, was zusätzlich auch auf einen direkten Einfluss von CIRP auf die Ausbildung von NETs schließen lässt.

Zusammenfassend konnten wir demonstrieren, dass das Fehlen von CIRP in den Knockout Mäusen die Prozesse der Angiogenese und Geweberegeneration positiv beeinflusst. Das vorherrschende Vorhandensein von regenerativen M2-ähnlichen Makrophagen, die reduzierte Anzahl von inflammatorischen M1-ähnlichen Makrophagen bei jedoch annähernd identischer Gesamt-Makrophagenanzahl am Ort der Ischämie-induzierten Entzündung sind Indikatoren für eine Abnahme pro-inflammatorischer Prozesse. Diese dezente Verschiebung in Richtung regenerativer Prozesse in den Knockout Tieren ohne Verminderung der Gesamt-Makrophagenanzahl führt zu einer effektiven Angiogenese und somit zu einer verbesserten Gewebereparatur bei CIRP Knockout Mäusen. Somit scheinen nicht nur die ausreichende Rekrutierung von Makrophagen, sondern insbesondere immunmodulatorische Prozesse - hin zu vermehrter Regeneration - die Angiogenese positiv zu beeinflussen. Mutmaßlich beeinflusst insbesondere das Fehlen von eCIRP als Entzündungsmediator die beobachteten Veränderungen in der Leukozytenrekrutierung und Makrophagenpolarisation. Allerdings könnte auch eine verbesserte Angiogenese ursächlich für eine beschleunigte Regeneration der Entzündung sein. In weiteren eigenen Studien konnte mittlerweile gezeigt werden [41], dass eine Depletion von eCIRP einen ähnlich verbessernden Effekt auf die Angiogenese hat wie bei Verwendung des CIRP Knockout Modells. Dies deutet darauf hin, dass die verbesserte Angiogenese und das verbesserte Gewebe-Remodeling auf den extrazellulären Funktionen des CIRPs und nicht der Defizienz der intrazellulären Funktion als RNA-Chaperon zurückzuführen sind. Durch das Fehlen von eCIRP wäre eine vermehrte Bioverfügbarkeit von extrazellulärer RNA möglich, welche dann, zusammen mit VEGF, vermehrt den NRP-1/VEGFR2 aktivieren kann [42] und hierüber eine verbesserte Angiogenese bedingt. Ein ähnlicher, angiogenesefördernder Effekt der extrazellulären RNA konnte eine kürzlich publizierte Studie im Rahmen der Neurovaskularisation bei Osteoarthritis nachweisen [43].

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

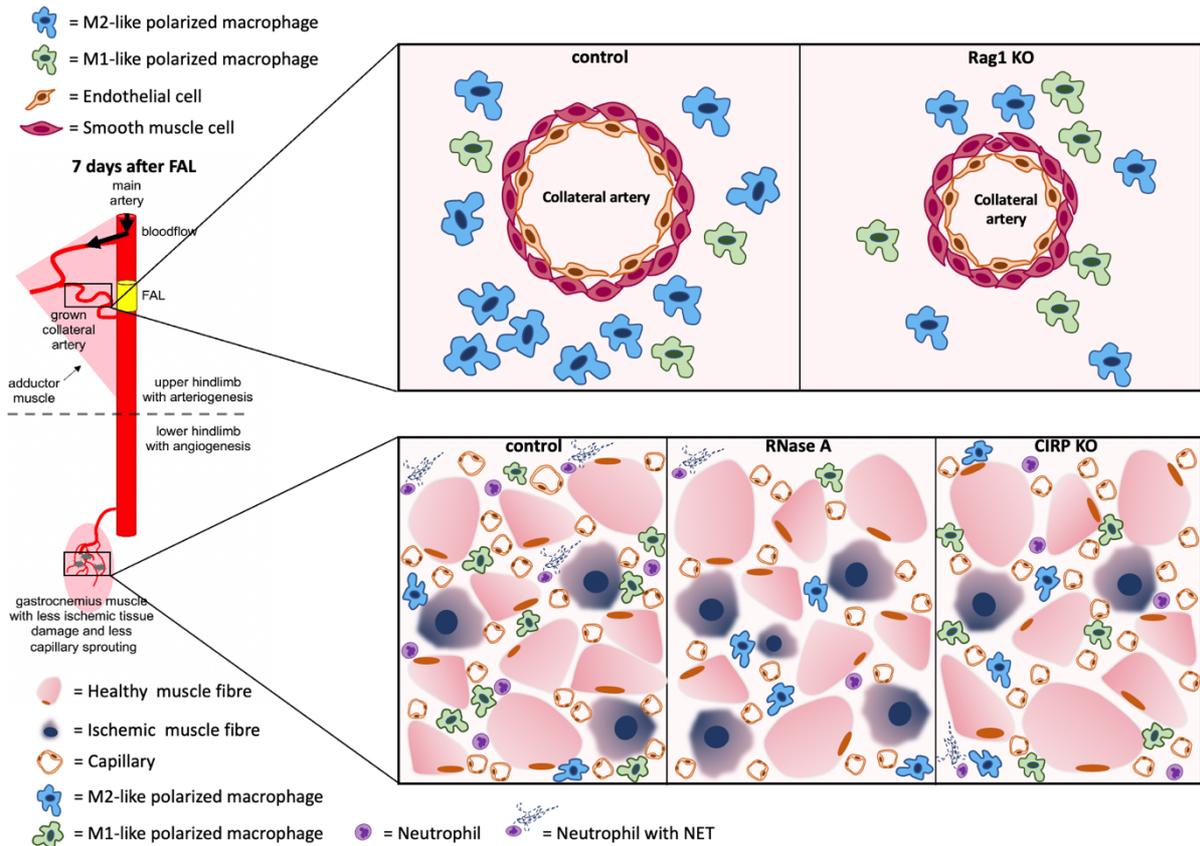
Im Jahr 2019 sind 8,89 Millionen Menschen weltweit an den Folgen von einer ischämischen Herzkrankheit und 6,19 Millionen Menschen an einem Schlaganfall verstorben [1]. Diese Zahlen verdeutlichen die aktuell bestehenden Limitationen der vorhandenen (meist invasiven) Therapieoptionen schwerer Formen dieser Erkrankungen. Es existieren jedoch körpereigene präventive Mechanismen um den Folgen von vaskulären Gefäßstenosen und -verschlüssen vorzubeugen in Form der Arteriogenese. Um hier medikamentöse Therapien etablieren zu können ist die exakte Aufklärung dieser Prozesse notwendig. In den dieser Habilitationsarbeit zu Grunde liegenden Originalarbeiten konnte erstmals eine Methode etabliert werden, die es ermöglicht, Schubspannung direkt *in vivo* in Kollateralgefäßen zu bestimmen. Dabei gelang es zusätzlich eine signifikante Erhöhung der Schubspannung *in vivo* in Kollateralgefäßen um eine verschlossene/ligierte Arterie im Vergleich zu Kollateralgefäßen um eine unverschlossene/nicht ligierte Arterie nachzuweisen. Dieser Nachweis ist zum einen von großer Relevanz, da die Schubspannung die treibende Kraft der Arteriogenese darstellt. Zum anderen ist hierdurch die Ausprägung der Schubspannung *in vivo* bekannt, um die Arteriogenese zu triggern. Diese Werte können nun auch beispielsweise für Flusskammerexperimente *in vitro* verwendet werden. Ebenso konnte eine Methodik etabliert werden, welche es ermöglicht Leukozyten und Thrombozyten *in vivo* und in Echtzeit in den Kollateralgefäßen nachzuverfolgen und deren Adhäsion und Extravasation darzustellen. Dabei zeigte sich nach FAL auch eine signifikant erhöhte Geschwindigkeit der Leukozyten im Vergleich zur scheinoperierten Seite. Diese neu etablierte Methodik kann als Grundlage für weitere *in vivo* Experimente zur genaueren Echtzeit-Analyse der Leukozytenadhäsion und -extravasation im Rahmen der Arteriogenese bei unterschiedlichen Behandlungsgruppen oder Knock-Out Modellen dienen. Weiterführend war es erstmals *in vivo* unter Verwendung des Hinterbein-Mausmodells möglich einen direkten Einfluss des erworbenen Immunsystems, im speziellen der B- und T-Zellen, während des Prozesses der Arteriogenese nachzuweisen (Abbildung 11).

Zusätzlich zu den neuen regulatorischen Erkenntnissen über die Arteriogenese, die durch die Gesamtheit der Habilitationsarbeit gewonnen wurden, können diese hier im Detail vorgestellten Methoden in Zukunft zusätzlich zu exakteren *in vivo* Analysen des Prozesses der Arteriogenese beitragen, um das übergeordnete Ziel der Entwicklung einer medikamentösen Therapie zur gezielten Förderung der Arteriogenese und zur Verringerung der Morbidität und Mortalität bei Gefäßverschlusskrankheiten zu erreichen.

Als Bestandteil zahlreicher physiologischer- und auch pathophysiologischer Prozesse [5-7] ist die vollständige Aufklärung der Angiogenese von hoher Relevanz, um neue therapeutische Ansätze zu generieren. Durch die hier zusammengefassten Originalarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Angiogenese durch die Applikation von RNase A signifikant verschlechtert ist, während das Fehlen von CIRP zu einer verbesserten Angiogenese beiträgt (Abbildung 11). Dabei nimmt sowohl die RNase A, als auch das Fehlen von CIRP, Einfluss auf die Inflammation und Rekrutierung von Leukozyten in die ischämischen Muskelbereiche.

Diese neu generierten Erkenntnisse können dabei in Zukunft zur Etablierung möglicher Therapieansätze, je nach entsprechendem Krankheitsbild, zur gezielten Förderung oder auch gezielten Hemmung der Angiogenese dienen. Dabei können, basierend auf den, im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten, nun weiterführende Forschungsarbeiten angeschlossen werden um dieses Ziel realisieren zu können.

Zusammenfassend konnten die Erkenntnisse dieser Arbeit, sowohl methodisch als auch inhaltlich einen relevanten Beitrag zur weiteren Erforschung der Arteriogenese und der Angiogenese liefern, um in Zukunft therapeutische nicht-invasive Ansätze zu entwickeln.



**Abbildung 11 (modifiziert nach Lasch et al. [20]).** Graphische Zusammenfassung.

Oberer Grafikbereich: Bei der Arteriogenese konnte gezeigt werden, dass der Knockout von Rag1, welcher in einem Fehlen von B- und T- Lymphozyten resultiert, 7 Tage nach Ligatur zu einem reduzierten Gefäßdurchmesser führt. Die Anzahl an M2-ähnlich polarisierten Makrophagen war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert, während die Anzahl M1-ähnlich polarisierter Makrophagen signifikant erhöht war.

Unterer Grafikbereich: 7 Tage nach Ischämieinduktion konnte im Rahmen der Angiogeneseanalysen gezeigt werden, dass unter RNase A Behandlung signifikant mehr ischämischer Gewebeschaden im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe entstanden ist, während unter Verwendung von CIRP Knockout-Tieren im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe signifikant weniger ischämischer Gewebeschaden nachweisbar war. Gleichzeitig ergab sich unter RNase A Behandlung ein reduziertes Kapillare zu Muskelfaserverhältnis, bei den CIRP Knockout-Tieren hingegen ein erhöhtes Verhältnis, jeweils im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. Bei Betrachtung der Makrophagen zeigte sich, im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe, unter RNase A Behandlung eine signifikant reduzierte Gesamtmakrophagenanzahl mit signifikant erhöhten M2-ähnlich polarisierten Makrophagen und signifikant reduzierten M1-ähnlich polarisierten Makrophagen. Bei den CIRP Knockout Mäusen ergab sich kein Unterschied in der Gesamtmakrophagenzahl, die M2-ähnlich polarisierten Makrophagen waren hier ebenfalls signifikant erhöht, die M1-ähnlich polarisierten Makrophagen signifikant erniedrigt. Die neutrophilen Granulozyten zeigten sich unter RNase A Behandlung deutlich, bei den CIRP Knockout Mäusen weniger stark signifikant zur entsprechenden Kontrollgruppe reduziert. Zusätzlich zeigte sich bei den CIRP Knockout Tieren eine signifikant reduzierte Anzahl von NETs pro neutrophilem Granulozyt.

## 5. Literaturverzeichnis

1. WHO, *The top 10 causes of death*. World Health Organization (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>), 2020.
2. Deindl, E. and W. Schaper, *The art of arteriogenesis*. Cell biochemistry and biophysics, 2005. **43**(1): p. 1-15.
3. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
4. Egginton, S., et al., *Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(3): p. 634-46.
5. Tonnesen, M.G., X. Feng, and R.A. Clark. *Angiogenesis in wound healing*. in *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2000. Elsevier.
6. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nature medicine, 1995. **1**(1): p. 27-30.
7. Capitão, M. and R. Soares, *Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy*. J Cell Biochem, 2016. **117**(11): p. 2443-53.
8. Gisterå, A. and G.K. Hansson, *The immunology of atherosclerosis*. Nature Reviews Nephrology, 2017. **13**(6): p. 368.
9. Kaelin, W.G., Jr. and P.J. Ratcliffe, *Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway*. Mol Cell, 2008. **30**(4): p. 393-402.
10. Ke, Q. and M. Costa, *Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(5): p. 1469-80.
11. Scapini, P., et al., *CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(8): p. 5034-5040.
12. Melincovici, C.S., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis*. Rom J Morphol Embryol, 2018. **59**(2): p. 455-467.
13. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-674.
14. Deindl, E., et al., *Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit*. Circulation research, 2001. **89**(9): p. 779-786.
15. Lautz, T., et al., *Midkine Controls Arteriogenesis by Regulating the Bioavailability of Vascular Endothelial Growth Factor A and the Expression of Nitric Oxide Synthase 1 and 3*. EBioMedicine, 2018. **27**: p. 237-246.
16. Pipp, F., et al., *Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(9): p. 1664-8.
17. Meisner, J.K., et al., *Trans-illuminated laser speckle imaging of collateral artery blood flow in ischemic mouse hindlimb*. J Biomed Opt, 2013. **18**(9): p. 096011.
18. Lasch, M., et al., *Extracellular RNA released due to shear stress controls natural bypass growth by mediating mechanotransduction in mice*. Blood, 2019. **134**(17): p. 1469-1479.
19. Chillo, O., et al., *Perivascular Mast Cells Govern Shear Stress-Induced Arteriogenesis by Orchestrating Leukocyte Function*. Cell Rep, 2016. **16**(8): p. 2197-2207.

20. Lasch, M., et al., *RNase A Treatment Interferes With Leukocyte Recruitment, Neutrophil Extracellular Trap Formation, and Angiogenesis in Ischemic Muscle Tissue*. *Front Physiol*, 2020. **11**: p. 576736.
21. Faber, J.E., et al., *A brief etymology of the collateral circulation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. **34**(9): p. 1854-9.
22. Limbourg, A., et al., *Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia*. *Nature protocols*, 2009. **4**(12): p. 1737.
23. Lasch, M., et al., *Estimating hemodynamic shear stress in murine peripheral collateral arteries by two-photon line scanning*. *Mol Cell Biochem*, 2019. **453**(1-2): p. 41-51.
24. Lanahan, A., et al., *The neuropilin 1 cytoplasmic domain is required for VEGF-A-dependent arteriogenesis*. *Developmental cell*, 2013. **25**(2): p. 156-168.
25. Lasch, M., et al., *Multiphoton Intravital Imaging for Monitoring Leukocyte Recruitment during Arteriogenesis in a Murine Hindlimb Model*. *J Vis Exp*, 2021(175).
26. Schaper, W. and D. Scholz, *Factors regulating arteriogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(7): p. 1143-51.
27. Flajnik, M.F., *A cold-blooded view of adaptive immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2018. **18**(7): p. 438-453.
28. Kumaraswami, K., et al., *Rag1 Deficiency Impairs Arteriogenesis in Mice*. *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(16).
29. Wynn, T.A. and K.M. Vannella, *Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis*. *Immunity*, 2016. **44**(3): p. 450-462.
30. Troidl, C., et al., *The temporal and spatial distribution of macrophage subpopulations during arteriogenesis*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2013. **11**(1): p. 5-12.
31. Adams, R.H. and K. Alitalo, *Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(6): p. 464-78.
32. Potente, M. and P. Carmeliet, *The Link Between Angiogenesis and Endothelial Metabolism*. *Annu Rev Physiol*, 2017. **79**: p. 43-66.
33. Weckbach, L.T., K.T. Preissner, and E. Deindl, *The Role of Midkine in Arteriogenesis, Involving Mechanosensing, Endothelial Cell Proliferation, and Vasodilation*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(9).
34. Aldabbous, L., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Promote Angiogenesis: Evidence From Vascular Pathology in Pulmonary Hypertension*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(10): p. 2078-87.
35. Kofler, N.M. and M. Simons, *Angiogenesis versus arteriogenesis: neuropilin 1 modulation of VEGF signaling*. *F1000prime reports*, 2015. **7**.
36. Zhong, P. and H. Huang, *Recent progress in the research of cold-inducible RNA-binding protein*. *Future Sci OA*, 2017. **3**(4): p. Fso246.
37. De Leeuw, F., et al., *The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(20): p. 4130-44.
38. Qiang, X., et al., *Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis*. *Nat Med*, 2013. **19**(11): p. 1489-1495.
39. Kübler, M., et al., *Absence of Cold-Inducible RNA-Binding Protein (CIRP) Promotes Angiogenesis and Regeneration of Ischemic Tissue by Inducing M2-Like Macrophage Polarization*. *Biomedicines*, 2021. **9**(4).
40. Murray, P.J., *Macrophage Polarization*. *Annu Rev Physiol*, 2017. **79**: p. 541-566.

41. Kübler, M., et al., *The Absence of Extracellular Cold-Inducible RNA-Binding Protein (eCIRP) Promotes Pro-Angiogenic Microenvironmental Conditions and Angiogenesis in Muscle Tissue Ischemia*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(17).
42. Fischer, S., et al., *Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells*. The FASEB Journal, 2009. **23**(7): p. 2100-2109.
43. Qin, W.P., et al., *Effect of Extracellular Ribonucleic Acids on Neurovascularization in Osteoarthritis*. Adv Sci (Weinh), 2023. **10**(26): p. e2301763.

## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Führende Todesursachen weltweit. ....	3
<b>Abbildung 2:</b> Die Arteriogenese im Oberschenkel schützt den M. gastrocnemius im Unterschenkel vor Ischämie. ....	5
<b>Abbildung 3:</b> Bestimmung von Blutflussgeschwindigkeit, Gefäßdurchmesser und Schubrate. ....	9
<b>Abbildung 4:</b> Arterienpräparation als Vorbereitung für die Intravital-Mikroskopie. ....	11
<b>Abbildung 5:</b> Gemessene Leukozytengeschwindigkeiten in Kollateralarterien nach Scheinoperation der Femoralarterie (Sham) und nach Ligatur der Femoralarterie (Occluded). ....	12
<b>Abbildung 6:</b> Verschlechterte Arteriogenese in Rag1 KO Mäusen. ....	14
<b>Abbildung 7:</b> Perivaskuläre Makrophagenpolarisation in Rag1 KO Mäusen. ....	15
<b>Abbildung 8:</b> Die Behandlung mit RNase A führt zu einer verringerten Angiogenese und einer erhöhten Gewebeschädigung. ....	18
<b>Abbildung 9:</b> RNase A Behandlung führt zu einer verringerten Anzahl von NETs. ....	20
<b>Abbildung 10:</b> CIRP Knockout fördert die Angiogenese. ....	23
<b>Abbildung 11:</b> Graphische Zusammenfassung. ....	28

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ACTA2	Alpha-Actin-2
aFAL	„after femoral artery ligation“/nach Femoralarterienligatur
BrdU	Bromdesoxyuridin
CD	„cluster of differentiation“
CIRP	„cold-inducible RNA-binding protein“
CitH3	citrullierendes Histon H3
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DAPI	„4',6-diamidino-2-phenylindole“
FAL	Femoralarterienligatur
FITC	„fluorescein- isothiocyanat“
HIF-1 $\alpha$	„hypoxia- inducible factor-1 $\alpha$ “
KO	Knockout
LDI	Laser-Doppler-Imaging
MPO	Myeloperoxidase
MRC1	„mannose receptor C-type 1“
NETs	„neutrophil extracellular traps“
NRP-1	Neuropilin-1
occ	okkludiert
Rag1	„recombination activating gene-1“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
S.E.M.	„standard error of the mean“
sham	scheinoperiert
VEGF-A	„vascular endothelial growth factor A“
VEGFR2	VEGF-Rezeptor-2
WT	Wildtyp

## 8. Vollständiges Schriftenverzeichnis

### Originalarbeiten:

#### Erst- oder Letztautorschaften:

Kumaraswami, K., Arnhold, C. Deindl, E., & **Lasch, M.** (2023). Rag1 Deficiency Impairs Arteriogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 12839. *Journal Impact Factor 2022: 5,6*

**Lasch, M.**, Sudan, K., Paul, C., Schulz, C., Kolben, T., Dorp, J. V., ... & Meister, S. (2022). Isolation of Decidual Macrophages and Hofbauer Cells from Term Placenta—Comparison of the Expression of CD163 and CD80. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6113. *Journal Impact Factor 2022: 5,6*

**Lasch, M.**, Vladymyrov, M., van den Heuvel, D., Götz, P., Deindl, E., & Ishikawa-Ankerhold, H. (2021). Multiphoton Intravital Imaging for Monitoring Leukocyte Recruitment During Arteriogenesis in a Murine Hindlimb Model. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (175). *Journal Impact Factor 2021: 1,4*

Götz, P., Braumandl, A., Kübler, M., Kumaraswami, K., Ishikawa-Ankerhold H., **Lasch, M.**, & Deindl E. (2021). C3 Deficiency Leads to Increased Angiogenesis and Elevated Pro-Angiogenic Leukocyte Recruitment in Ischemic Muscle Tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11):5800. *Journal Impact Factor 2021: 6,2*

Kübler, M., Beck, S., Fischer, S., Götz, P., Kumaraswami, K., Ishikawa-Ankerhold, H., **Lasch, M.**, & Deindl, E. (2021). Absence of Cold-Inducible RNA-Binding Protein (CIRP) Promotes Angiogenesis and Regeneration of Ischemic Tissue by Inducing M2-Like Macrophage Polarization. *Biomedicines*, 9(4), 395. *Journal Impact Factor 2021: 4,8*

**Lasch, M.**, Kumaraswami, K., Nasiscionyte, S., Kircher, S., van den Heuvel, D., Meister, S., ... & Deindl, E. (2020). RNase A Treatment Interferes With Leukocyte Recruitment, Neutrophil Extracellular Trap Formation, and Angiogenesis in Ischemic Muscle Tissue. *Frontiers in physiology*, 11, 576736. *Journal Impact Factor 2020: 4,6*

**Lasch, M.**, Caballero Martinez, A., Kumaraswami, K., Ishikawa-Ankerhold, H., Meister, S., & Deindl, E. (2020). Contribution of the Potassium Channels KV1. 3 and KCa3. 1 to Smooth Muscle Cell Proliferation in Growing Collateral Arteries. *Cells*, 9(4), 913. *Journal Impact Factor 2020: 6,6*

**Lasch, M.,** Kleinert, E. C., Meister, S., Kumaraswami, K., Buchheim, J. I., Grantzow, T., ... & Deindl, E. (2019). Extracellular RNA released due to shear stress controls natural bypass growth by mediating mechanotransduction in mice. *Blood*, *134*(17), 1469-1479.

*Journal Impact Factor 2019: 17,8*

**Lasch, M.,** Nekolla, K., Klemm, A. H., Buchheim, J. I., Pohl, U., Dietzel, S., & Deindl, E. (2019). Estimating hemodynamic shear stress in murine peripheral collateral arteries by two-photon line scanning. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *453*(1-2), 41-51.

*Journal Impact Factor 2019: 2,8*

**Lasch, M.,** Caballero-Martinez, A., Troidl, K., Schloegl, I., Lautz, T., & Deindl, E. (2016). Arginase inhibition attenuates arteriogenesis and interferes with M2 macrophage accumulation. *Laboratory Investigation*, *96*(8), 830-8.

*Journal Impact Factor 2016: 4,9*

## Originalarbeiten:

### Koautorschaften:

Götz, P., Azubuiké-Osu S. O., Braumandl, A., Arnholdt, C., Kübler, M., Richter, L., **Lasch, M.**, Bobrowski, L. Preissner K. T., & Deindl, E. (2022). Cobra Venom Factor Boosts Arteriogenesis in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8454.

*Journal Impact Factor 2022: 5,6*

Arnholdt, C., Kumaraswami, K., Götz, P., Kübler, M., **Lasch, M.**, & Deindl, E. (2022). Depletion of  $\gamma\delta$  T Cells Leads to Reduced Angiogenesis and Increased Infiltration of Inflammatory M1-like Macrophages in Ischemic Muscle Tissue. *Cells*, 11(9), 1490.

*Journal Impact Factor 2022: 6,0*

Kübler, M., Beck, S., Pfeffenköver, L. L., Götz, P., Ishikawa-Ankerhold, H., Fischer, S., Preissner, K. T., **Lasch, M.**, & Deindl, E. (2021). The Absence of Extracellular Cold-inducible RNA-binding Protein (eCIRP) Promotes Pro-Angiogenic Microenvironmental Conditions and Angiogenesis in Muscle Tissue Ischemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9484.

*Journal Impact Factor 2021: 6,2*

Chen, C. S., Weber, J., Holtkamp, S. J., Ince, L. M., de Juan, A., Wang, C., ..., **Lasch, M.**, ... & Scheiermann, C. (2021). Loss of direct adrenergic innervation after peripheral nerve injury causes lymph node expansion through IFN- $\gamma$ . *Journal of Experimental Medicine*, 218(8), e20202377.

*Journal Impact Factor 2021: 17,6*

Kumaraswami, K., Salei, N., Beck, S., Rambichler, S., Kluever, A. K., **Lasch, M.**, ... & Deindl, E. (2020). A Simple and Effective Flow Cytometry-Based Method for Identification and Quantification of Tissue Infiltrated Leukocyte Subpopulations in a Mouse Model of Peripheral Arterial Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3593.

*Journal Impact Factor 2020: 5,9*

Thulasingam, S., Krishnasamy, S., Raj, C., **Lasch, M.**, Vedantham, S., & Deindl, E. (2019). Insulin Treatment Forces Arteriogenesis in Diabetes Mellitus by Upregulation of the Early Growth Response-1 (Egr-1) Pathway in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3320.

*Journal Impact Factor 2019: 4,6*

Else Müller, A. K., Tomalla, V., Gärtner, U., Troidl, K., Jeratsch, S., Graumann, J., Baal, N., Hackstein, H., **Lasch, M.**, ... & Fischer S. (2019). Characterization of mast cell-derived rRNA-containing microvesicles and their inflammatory impact on endothelial cells. *The FASEB Journal*, 33(4), 5457-5467.

*Journal Impact Factor 2019: 5,0*

Lautz, T., **Lasch, M.**, Borgolte, J., Troidl, K., Pagel, J. I., Caballero-Martinez, A., ... & Deindl, E. (2018). Midkine Controls Arteriogenesis by Regulating the Bioavailability of Vascular Endothelial Growth Factor A and the Expression of Nitric Oxide Synthase 1 and 3. *EBioMedicine*, 27, 237-246.  
*Journal Impact Factor 2018: 6,7*

Chillo, O., Kleinert, E. C., Lautz, T., **Lasch, M.**, Pagel, J. I., Heun, Y., ... & Deindl, E. (2016). Perivascular mast cells govern shear stress-induced arteriogenesis by orchestrating leukocyte function. *Cell Reports*, 16(8), 2197-2207.  
*Journal Impact Factor 2016: 8,3*

## 9. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Martin Canis herzlichst für die Begleitung und Betreuung meiner wissenschaftlichen Arbeit und Habilitation sowie die hervorragende klinische Ausbildung in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt darüber hinaus Frau Prof. Dr. rer. nat. Elisabeth Deindl, die mich seit Beginn meiner wissenschaftlichen Tätigkeit, zunächst als Doktormutter, später als Mentorin, seit nunmehr fast 10 Jahren auf meinem Weg begleitet. Lisa, ich danke Dir für all die wertvollen Ratschläge und unermüdliche Förderung und Motivation bei der wissenschaftlichen Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Reichel möchte ich zum einen als weiteres Mitglied meines Fachmentorats für die Unterstützung während meiner Habilitation, zum anderen als Oberarzt der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde für die intensive Förderung meiner klinischen Ausbildung herzlich danken.

Den aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der AG Deindl möchte ich ebenfalls für die hervorragende Zusammenarbeit während der letzten Jahre danken.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und dabei insbesondere meiner Ehefrau. Liebe Sarah, deine permanente Unterstützung und Motivation als exzellente Wissenschaftlerin und Ärztin ermöglichten mir die Fertigstellung dieser Arbeit.

## **10. Versicherung an Eides Statt**

Ich, Manuel Lasch, geboren am 11.06.1993, erkläre hiermit an Eides Statt, dass die hier vorliegende schriftliche Habilitationsleistung selbständig verfasst und die Herkunft des verwendeten oder zitierten Materials ordnungsgemäß kenntlich gemacht ist.

Ebenso versichere ich, dass ich nicht schon zweimal ein Habilitationsverfahren im gleichen Fach ohne Erfolg beendet habe, oder mir ein akademischer Grad entzogen worden ist und auch kein Verfahren gegen mich anhängig ist, das die Entziehung eines akademischen Grades zur Folge haben könnte.

München, 17.01.2024

Manuel Lasch