

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

**Protektiver Effekt einer *Hyaluronsäuresynthase (Has)-3*
spezifischen Inhibition der Hyaluronsäuresynthese auf die
Entwicklung und den Schweregrad der Dextrannatriumsulfat-
induzierten Kolitis im Mausmodell**

Dissertation

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

vorgelegt von
Anette von Glinski

2019

Angabe der Referenten

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

gez.:

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

Erstgutachter: Univ.- Prof. Dr. Jens W. Fischer

Zweitgutachter: Univ.- Prof. Dr. med. Hans Bock

Zusammenfassung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind multifaktoriell bedingte Entzündungen des Darms, charakterisiert durch pathologische Umbauprozesse der Darmschleimhaut und Einwanderung von Entzündungszellen. Es konnte gezeigt werden, dass Hyaluronsäure (HA), ein Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix (EZM), welcher von drei HA-Synthasen (HAS-1, -2,-3) synthetisiert wird, im Rahmen der CED im Kolongewebe akkumuliert. Ziel dieser Studie war daher, den Einfluss eines (I) *Has-3* spezifischen Knockouts (*Has-3* KO) im Vergleich zu einer (II) pharmakologischen HA-Synthese-Inhibition mittels des Nicht-Isoenzym-spezifischen HAS-Inhibitors 4-Methylumbelliferon (4-MU) auf die Entwicklung und den Verlauf der CED im Dextrannatriumsulfat (*dextran sodium sulfate*; DSS)-induzierten murinen Model der akuten Kolitis zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass eine *Has-3* Defizienz keiner Verringerung der gewebebeständigen HA-Verteilung führte, sodass physiologische Aufgaben der HA nicht reduziert werden. Darüber hinaus war die *Has-3* Defizienz mit protektiven Effekten auf die Entwicklung und den Schweregrad der sich entwickelnden Kolitis verbunden. Dabei kam es zu einem geringeren Gewichtsabfall, einem besseren histologischen *Outcome* und es trat eine geringere Einwanderung von Leukozyten und Makrophagen in das entzündete Gewebe auf.

Durch eine Nicht-Isoenzym-spezifische Inhibition der HA-Synthese durch 4-MU konnten wir eine verringerte Expression von HA sowohl basal, als auch während der DSS-induzierten Kolitis nachweisen.

Diese führte jedoch zu negativen Effekten im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis: Es kam zu einer verstärkten Destruktion der Kolonschleimhaut sowie zu einer verstärkten Einwanderung von Leukozyten und Makrophagen. Ebenso war die Expression proinflammatorischer Zytokine deutlich erhöht.

Summary

Chronic inflammatory diseases (CED) are multifactorially induced inflammations of the intestine, characterized by pathological reorganization processes of the intestinal mucosa and migration of inflammatory cells. Hyaluronic acid (HA), a major component of the extracellular matrix (EZM) synthesized by three HA synthases (HAS-1, -2, -3), has been shown to accumulate in colon tissue. Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of a (I) Has-3 specific knockout (Has3-KO) compared to a (II) pharmacological HA synthesis inhibition using the non-isoenzyme-specific HAS inhibitor 4-methylumbelliferone (4-MU) on the development and course of CED in the dextran sodium sulfate (DSS) -induced murine model of acute colitis.

The present work has shown that a *Has-3* deficiency did not lead to a reduction in the tissue-bearing HA accumulation, so that physiological tasks of the HA are not reduced. In addition, the *Has-3* deficit was associated with protective effects on the development and severity of the developing colitis. This resulted in a lesser weight loss, a better histological outcome, and a lower migration of leukocytes and macrophages into the inflamed tissue.

By a non-isoenzyme-specific inhibition of HA synthesis by 4-MU, we were able to detect a reduced expression of HA both basally and during DSS-induced colitis.

However, this led to negative effects in the context of DSS-induced colitis: increased destruction of the colonic tissue as well as increased migration of leukocytes and macrophages. Similarly, the expression of proinflammatory cytokines was significantly increased.

Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon	Hyal	Hyaluronidase
5-ASA	5-Aminosalicylat	Ig	Immunglobulin
Abb.	Abbildung	IL(-1β)	Interleukin(-1 β)
AK	Antikörper	KBD	Kurze Behandlungsdauer
BGW	Bindegewebe	KO	<i>Knockout</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	LBD	Lange Behandlungsdauer
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	LMM	<i>Lamina muscularis mucosae</i>
cDNA	komplementäre DNA	LMW	<i>Low molecular weight</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung	LP	<i>Lamina propria</i>
COX	Cyclooxygenase	M	Mukosa
CU	Kolitis ulcerosa	MC	Morbus Crohn
Da	Dalton	MCP-1	Macrophagen chemoattraktives Protein-1
DAB	Diaminobenzidin	MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat	MK	Muskularis
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)	mRNA	<i>Messenger RNA</i>
dNTP	2-desoxy-Ribonukleosidtriphosphat	n	Anzahl (<i>number</i>)
DSS	Dextrannatriumsulfat (<i>Dextran sodium sulfate</i>)	PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
DTT	Dithiothreitol	PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	pH	<i>potentia hydrogenii</i>
EZM	Extrazellulärmatrix	qRT-PCR	Quantitative real-time Polymerase-Ketten (<i>Chain</i>) - Reaktion
Fab	<i>antigen binding fragment</i>	RANTES	<i>Regulated upon activation normal T-cell expressed, and presumably secreted</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>	RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
FCS	Fötales Kälberserum	rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	SEM	<i>standard error of the mean</i> Standardfehler des Mittelwerts
GDW	Gesamte Darmwand	SM	Submukosa
HA	Hyaluronsäure (<i>hyaluronan acid</i>)	SMC	<i>Small muscular cells</i>
HABP	Hyaluronsäurebindeprotein	TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
HAS	Hyaluronsäuresynthase	TLR	<i>Toll-like receptor</i>
HE	Hämalaun-Eosin	TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
HIMEC	Humane intestinale mikrovaskuläre Endothelzellen (<i>human intestinal microvascular endothelial cells</i>)	Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
HMW	<i>High molecular weight</i>	Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>	WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des HA-Systems: In Anlehnung an die Darstellung.	6
Abbildung 2: Behandlungsverlauf der <i>Has-3</i> KO Studie.....	14
Abbildung 3: Behandlungsverlauf der Arzneimittelgruppe (4-MU).....	14
Abbildung 4: Histologischer Darmquerschnitt	17
Abbildung 5: Ausschnittsvergrößerung der Mukosa.....	17
Abbildung 6: Verteilung von HA innerhalb der einzelnen Darmschichten der Kolonwand	24
Abbildung 7: Gewichtsverlauf <i>Has-3</i> -defizienter Mäuse im Vergleich zu WT Geschwistertieren nach DSS-Behandlung.....	25
Abbildung 8: Veränderungen der Kolonlänge und des Kolongewichts unter DSS-Behandlung.	26
Abbildung 9: Exemplarische Darstellung histologischer Veränderungen im Rahmen der DSS- induzierten Kolitis	27
Abbildung 10: Histologische Beurteilung des Schweregrades der Kolitis	28
Abbildung 11: Detektion von Leukozyten mittels einer CD45-Färbung innerhalb der Mukosa	29
Abbildung 12: Detektion F4/80-positiver Makrophagen innerhalb der Mukosa.....	30
Abbildung 13: Histologische Verteilung und Genexpressionsanalyse von Biglykan innerhalb distaler Kolonabschnitte	31
Abbildung 14: Histologische Verteilung und Genexpressionsanalyse von Decorin innerhalb distaler Kolonabschnitte	32
Abbildung 15: Verteilung von HA innerhalb der einzelnen Darmschichten der Kolonwand ..	35
Abbildung 16: Gewichtsverlauf 4-MU behandelte Tiere im Vergleich zu Placebo Tieren nach DSS-Behandlung.....	36
Abbildung 17: Veränderungen der Kolonlänge und des Kolongewichts unter DSS- Behandlung	37
Abbildung 18: Histologische Beurteilung des Schweregrades der Kolitis	39
Abbildung 19: Detektion von Leukozyten mittels CD45-Färbung innerhalb der Mukosa	41
Abbildung 20: Detektion F4/80-positiver Makrophagen innerhalb der Mukosa.....	42
Abbildung 21: Darstellung der mRNA Expression proinflammatorischer Zytokine	43
Abbildung 22: Histologische Verteilung und Genexpressionsanalyse von Biglykan innerhalb distaler Kolonabschnitte	45
Abbildung 23: Histologische Verteilung und Genexpressionsanalyse von Decorin innerhalb distaler Kolonabschnitte	47
Abbildung 24: Bestimmung der mRNA Expression von Cd44.....	48
Abbildung 25: Bestimmung der mRNA Expression von Rhamm.....	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen zu Gewebepräparation und Histologie.....	10
Tabelle 2: Verwendete Blockierlösungen zur Gewebepräparation und Histologie.....	10
Tabelle 3: Verwendete Farbstoffe und Farblösungen	10
Tabelle 4: Verwendete Substanzen in der Genexpressionsanalyse.....	11
Tabelle 5: Verwendete Substanzen in der Histochemie.....	11
Tabelle 6: Verwendete Arzneistoffe	11
Tabelle 7: Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie	11
Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper in der Immunhistochemie	11
Tabelle 9: Verwendete Bindeproteine.....	12
Tabelle 10: Verwendeter Screening-Test.....	12
Tabelle 11: Histologischer Kolitis-Punktescore.	18
Tabelle 12: Verwendete Primer	22

Inhalt

PROTEKTIVER EFFEKT EINER <i>HYALURONSÄURESYNTHASE (HAS)-3</i> SPEZIFISCHEN INHIBITION DER HYALURONSÄURESYNTHESE AUF DIE ENTWICKLUNG UND DEN SCHWEREGRAD DER DEXTRANNATRIUMSULFAT-INDUZIERTEN KOLITIS IM MAUSMODELL	I
ANGABE DER REFERENTEN	II
ZUSAMMENFASSUNG	III
SUMMARY	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankung	1
1.1.1 Pathophysiologie	1
1.1.2 Therapie der Kolitis ulcerosa	1
1.2 Hyaluronsäure	3
1.2.1 Hyaluronsäure-Funktion	3
1.2.2 Hyaluronsäure-Synthese	4
1.2.3 Hyaluronsäure-Degradation	4
1.2.4 Hyaluronsäure-Rezeptoren	5
1.2.5 Pharmakologische Beeinflussung der Hyaluronsäure-Synthese	5
1.3 Hyaluronsäuresystem und chronisch entzündliche Darmerkrankungen	6
1.3.1 Hyaluronsäure	6
1.3.2 Rezeptoren	7
1.3.3 Hyaluronsäuresynthasen-Expression	7
1.3.4 Ziel	8
2 FRAGESTELLUNG	9
3 MATERIAL UND METHODEN	10
3.1 Material	10
3.1.1 Puffer und Lösungen	10
3.1.2 Farbstoffe und Farblösungen	10
3.1.3 Substanzen und Arzneistoffe	11
3.1.4 Antikörper	11
3.1.5 Screening-Test	12
3.2 Methoden	13
3.2.1 Tiere und Futter	13
3.2.1.1 Futtermischungen	13
3.2.1.2 Dextrannatriumsulfat-induzierte Kolitis	13
3.2.2 Studiendesign	14
3.2.2.1 Selektiver Hyaluronsäuresynthase-3 Knockout	14
3.2.2.2 Systemische Hyaluronsäure Inhibition mittels 4-Methylumbelliferon	14

3.2.3	Bewertung der akuten Kolitis	15
3.2.3.1	Gewichtsverlauf	15
3.2.3.2	Makroskopische Veränderungen	15
3.2.4	Präparation der Mäuse zur weiteren Analyse	15
3.2.4.1	Dickdarmentnahme und -aufbereitung	15
3.2.5	Auswertung von histologischem Material	16
3.2.5.1	Gefrierschnitte	16
3.2.6	Histologische Analyse des Schweregrades der Kolitis	16
3.2.6.1	Hämalaun-Eosin (HE) Färbung	16
3.2.6.2	Histologische Beurteilung des Schweregrades der Kolitis	16
3.2.7	Histologische Analyse der Extrazellulärmatrix-Komponenten und der inflammatorischen Zellen	18
3.2.7.1	Immunhistochemische Färbungen	18
3.2.7.2	Mikroskop	19
3.2.7.3	Quantitative Auswertung mittels Image J	20
3.2.8	Isolierung und Analyse von Ribonukleinsäure aus Dickdarm	20
3.2.8.1	Ribonukleinsäure-Isolierung	20
3.2.8.2	Ribonukleinsäure-Quantifizierung	20
3.2.8.3	Reverse Transkription	21
3.2.9	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (q-PCR)	21
3.2.10	Statistik	23
4	ERGEBNISSE	24
4.1	Hyaluronsäure-Expression bei einer isolierten <i>Hyaluronsäuresynthase-3</i> Defizienz	24
4.2	Einfluss einer isolierten <i>Hyaluronsäuresynthase-3</i> Defizienz auf den Schweregrad und die Ausprägung der akuten Kolitis	25
4.2.1	Gewichtsverlauf	25
4.2.2	Makroskopische Veränderung von Kolongewicht und -länge	26
4.2.3	Histologische Beurteilung der Darmstruktur	27
4.3	Inflammation	29
4.3.1	Histologische Analyse von Leukozyten	29
4.3.2	Histologische Analyse von F4/80-positiven Makrophagen	30
4.4	Extrazellulärmatrix-Komponenten	31
4.4.1	Biglykan	31
4.4.2	Decorin	32
4.5	Hyaluronsäure-Expression im Rahmen einer pharmakologischen, Nicht-Isoenzym-spezifischen Hyaluronsäure-Synthese-Inhibition mittels 4-Methylumbelliferon	33
4.6	Einfluss einer Nicht-Isoenzym-spezifischen Inhibition der Hyaluronsäuresynthese auf den Schweregrad und die Ausprägung der akuten Kolitis	36
4.6.1	Gewichtsverlauf	36
4.6.2	Makroskopische Veränderung der Kolongewicht und -länge	37
4.6.3	Histologische Beurteilung der Darmstruktur	38
4.7	Inflammation	40
4.7.1	Histologische Analyse von Leukozyten	41
4.7.2	Histologische Analyse von F4/80-positiven Makrophagen	42
4.7.3	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion-Untersuchungen proinflammatorischer Zytokine	43

4.8	Extrazellulärmatrix	44
4.8.1.1	Biglykan	44
4.8.1.2	Decorin	46
4.9	Genexpression weiterer Komponenten des Hyaluronsäure-Systems	48
4.9.1	Cd44	48
4.9.2	Rhamm	48
5	DISKUSSION	49
5.1	Hyaluronsäuresynthase-3 Defizienz	50
5.2	Pharmakologisch Nicht-Isoenzym-spezifische Inhibition der Hyaluronsäure-Synthese	54
5.3	Fazit	58
6	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	XI

1 Einleitung

1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen stellen multifaktoriell bedingte Entzündungen des Darms dar, die durch rezidivierende blutige Diarrhoen und Tenesmen klinisch in Erscheinung treten [1]. Es lassen sich schubförmige von chronischen Verläufen unterscheiden. Die beiden Hauptformen Kolitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) unterscheiden sich in ihrem makroskopischen als auch histologischen Befallsmuster. Die CU beginnt im Rektum und beschränkt sich in der Regel auf den Dickdarm und tritt in der Mukosa und Submukosa der Darmschleimhaut auf. Die MC breitet sich hingegen segmentförmig über Dickdarm- als auch distale Dünndarmabschnitte, in Fällen auch auf die Magenschleimhaut übergreifend, aus und befällt alle Darmschichten [1]. Die Inzidenz der CU beträgt insgesamt in Deutschland 3,0-3,9/100.000 pro Jahr [2, 3], welche gehäuft um das 15.-25. Lebensjahr in Erscheinung tritt [2, 4]. Damit handelt es sich um eine Erkrankung des jungen Lebensalters, die mit einer langen Behandlungsphase über die Schul- und Berufsausbildung hinaus bis in das höhere Lebensalter verbunden ist.

Die genaue Ätiologie der CED ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Einflussfaktoren stellen eine Dysregulation des Immunsystems sowie genetische und Umweltfaktoren dar [5].

1.1.1 Pathophysiologie

Pathophysiologisch wird ein Ungleichgewicht der Immunabwehr gegen kommensale Bakterien als ursächlich erachtet [6]. Zum einen bietet eine durchlässige Epithelbarriere keinen anhaltenden Schutz gegen gastrointestinale Bakterien [7]. Zum anderen weisen Immunzellen ein verändertes *Toll-like-Rezeptor* (TLR)-Profil auf. Das führt über eine Modulation von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*pathogen-associated molecular pattern*; PAMP) zu einer gestörten Antigenerkennung und -prozessierung durch dendritische Zellen [8]. Eine gesteigerte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt zu einer massiven Einwanderung von Entzündungszellen [9]. Diese akkumulieren und setzen wiederum selbst aggressive Metabolite und Mediatoren frei, die zu einer weiteren Zerstörung der Darmschleimhaut und Kryptenarchitektur beitragen [10].

1.1.2 Therapie der Kolitis ulcerosa

Bei der Auswahl der geeigneten Therapiemethode werden Befallsmuster, Krankheitsaktivität, extraintestinale Manifestation (Mund, Auge, Gelenke, Haut), Vor- und Begleitmedikation und Nebenwirkungsprofile berücksichtigt [1]. Es wird dabei eine akute Schubtherapie von einer remissionserhaltenden Therapie unterschieden [1].

Die pharmakologische Therapie bleibt bislang auf unspezifische anti-inflammatorische und immunsuppressive Komponenten beschränkt. Diese führen zu einer Reduktion der klinischen Beschwerden, können aber in häufigen Fällen keine ausreichende Remission der Erkrankung erzielen. Damit kann die aktuelle Therapie zum jetzigen Zeitpunkt keine vollständige Ausheilung der Krankheit bewirken [11]. Bei leichten bis mittelschweren Formen der CU wird laut Therapie-Leitlinie aktuell 5-Aminosalicylat (5-ASA) verwendet [1]. Der genaue Wirkmechanismus von 5-ASA ist derzeit noch nicht abschließend geklärt [12]. Frühere Studien legen nahe, dass 5-ASA durch Inhibition von Leukotrienen und Prostaglandin E₂, sowie Produktion freier Radikale antiinflammatorische Effekte hat [13]. Die Applikationsform (topisch versus oral) hängt von der Lokalisation des befallenen Darmabschnittes ab. Bei einem ausgedehnten Befall wird in der Regel die Dosis von oralem 5-ASA gesteigert. Klinische Studien beweisen, dass eine Dosisabhängigkeit hinsichtlich des Ansprechens auf die Therapie, jedoch nicht hinsichtlich der Remission besteht. Im Falle des Versagens der Therapie mit 5-ASA werden bei der Proktitis topische Steroide verwendet. Eine systemische Steroidtherapie erfolgt bei der Linksseitenkolitis und ausgedehntem Befall. Bei schweren Formen der CU v.a. mit systemischer Beteiligung ist eine stationäre Aufnahme indiziert und es wird eine intravenöse Steroidtherapie eingeleitet. Tritt eine Kontraindikation für oder Intoleranz gegen eine Steroidtherapie auf, werden je nach Begleiterkrankungen und Nebenwirkungsprofil Calcineurin-Inhibitoren wie Ciclosporin A bzw. Tacrolimus oder auch Infliximab, ein monoklonaler Antikörper gegen Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) eingesetzt. Nach Ansprechen der Therapie kann im Hinblick auf das Nebenwirkungsprofil dieser Medikamente auf Thiopurine wie Azathioprin oder 6-Mercaptopurin gewechselt werden. Kommt es im Krankheitsfall trotz dieser Therapie zu einer Verschlechterung des Zustandes, sollte eine chirurgische Intervention angedacht werden. Zum jetzigen Zeitpunkt laufen verschiedene Studien, welche sich vor Abschluss oder noch in der Auswertungsphase befinden. Die vorläufigen Ergebnisse zeigen ein positives Ansprechen auf Adalimumab, einen weiteren TNF- α Antikörper, sowie ein positives Ansprechen auf die Leukozyten-Apherese. Die Methotrexat-Therapie bleibt umstritten, da bislang kein Vorteil gegenüber den beschriebenen Leitlinientherapien festgestellt werden kann.

Entsteht ein akuter Schub während der Remissionserhaltung, erfolgt zunächst die Dosiserhöhung von 5-ASA, in schweren Fällen die Therapie mit Thiopurinen. Bei Nichtansprechen wird auf eine systemische Steroidtherapie gewechselt [1].

Chirurgisch ist derzeit eine restaurative Proktokolektomie (Entfernung von Rektum und Kolon) mit ileoanaler Pouchanlage (Anlage eines Reservoirs durch direkte Verbindg zwischen Ileum und Anus) Goldstandard. Indikation zu einer operativen Therapie stellen therapierefraktäre Blutungen/Verlauf, eine Kolonstenose oder intraepitheliale Neoplasie und

gesicherte Karzinome dar. Akute chirurgische Notfälle, wie das toxische Megakolon, die freie oder gedeckte Perforation, eine nicht stillbare Hämorrhagie oder Abszesse mit konsekutiver Sepsis, stellen die Notfallindikation zu einer Operation. Wenn möglich erfolgt direkt anschließend die Anlage einer kontinenzhaltenden ileoanalen Pouch. Bei erhöhtem perioperativem Risiko sollte die Proktokolektomie dreizeitig über eine zwischenzeitliche Ileostoma-Anlage (Ausleitung des Dünndarms an die Hautoberfläche) operiert werden. Trotz Operation ist die Mortalität mit 20% hoch, zudem kann es zu einer Mangelernährung, Inkontinenz und Pouchitis kommen [1].

Da bei Patienten mit Kolitis ulcerosa ein erhöhtes Kolorektales Karzinomrisiko im Vergleich zur Normalbevölkerung vorliegt, sollen regelmäßige Überwachungskoloskopien erfolgen [1].

1.2 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA), ein hochmolekulares Polysaccharid aus alternierend verbundenen Einheiten von D-Glukuronsäure und N-Acetyl-Glucosamin unterschiedlicher Kettenlänge, ist ein ubiquitärer Bestandteil der Extrazellulärmatrix [14]. Eine schematische Darstellung des Hyaluronsäuresystems ist in Abbildung 1 aufgeführt.

1.2.1 Hyaluronsäure-Funktion

Die lange Zeit bestehende Ansicht, HA erfülle aufgrund ihrer hohen wasserbindenden Kapazität lediglich die Funktion eines viskösen Füllmaterials [15], das dem Gewebe sowohl Stabilität als auch Flexibilität verleiht, ist überholt. Es können ihr eine Vielzahl anderer Funktionen zugeschrieben werden. HA ist an der Bildung der perizellulären Matrix beteiligt, welche maßgeblich an Zellmigration und –proliferation beteiligt ist [16]. Ebenso nimmt HA an Prozessen der Embryogenese [17] und der Regeneration von Geweben teil [18]. Als Ursache für die unterschiedlichen Zellantworten wird dabei die Kettenlänge der HA diskutiert. Hochmolekulare (*high-molecular weight*; HMW) HA mit einem Molekulargewicht von 2×10^5 bis 2×10^6 Dalton (Da) gilt als anti-angiogen [19, 20], immunsupprimierend [21, 22] und anti-inflammatorisch. Beispielsweise führt eine HA-Quervernetzung mit *Pentraxin-related protein 3*, *Thrombospondin 1*, *Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein* zu einer verstärkten Bindung von Leukozyten an diese HA-Strängen, wodurch der Kontakt von Leukozyten mit anderen inflammatorischen Rezeptoren verhindert wird [23]. Demgegenüber wird die fragmentierte, niedermolekulare (*low-molecular weight*; LMW) HA mit einem Molekulargewicht <120 kDa [24] als angiogen [25], proinflammatorisch [26, 27] und migrationsfördernd [28, 29] beschrieben. Neuere Versuche konnten zeigen, dass HA-Oligosaccharide, ähnlich den exogenen PAMPs, über TLR, insbesondere TLR-2 und -4, als Gefahrensignale an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind [30]. Darüber hinaus induzieren HA-Fragmente die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-12 [30] sowie C-C Chemokine MIP (*Macrophage inflammatory protein*)-1 α ,

MIP-1 β und RANTES (*regulated upon activation normal T-cell expressed, and presumably secreted*) [31] und können so zu einer verstärkten Aktivierung von Makrophagen führen [32].

1.2.2 Hyaluronsäure-Synthese

Die Synthese von HA erfolgt über die membranständigen HA-Synthasen- 1-3 (HAS- 1-3) [33, 34], die von diversen Zelltypen exprimiert werden. Die Polymerisation der einzelnen Zucker erfolgt unter Beteiligung von Uridindiphosphat. Die sich bildenden HA-Polymere werden hierbei über Porenstrukturen in den Extrazellulärraum entlassen [35] (Abb. 1). Die drei Synthasen verfügen über ähnliche Aminosäuresequenzen, aber über unterschiedliche Aktivitäten [33]. Die Regulation und Aktivierung der HA-Synthese wird durch Wachstumsfaktoren (*growth factors*) und Zytokine, insbesondere TNF- α und IL-1 β , in Abhängigkeit vom Zelltyp und dem physiologischen Kontext vermittelt [36]. Ebenso zeigen Studien, dass die drei unterschiedlichen HAS-Isoenzyme unterschiedliche biologische Funktionen steuern. So konnte bewiesen werden, dass Mesenchymalzellen im Umfeld von Myelomen eine Überexpression von HAS-1 aufweisen [37]. Eine HAS-2 gesteuerte Produktion von HA in Hautfibroblasten führt beispielsweise zu einer gesteigerten Wundheilung im Rahmen der durch Stressfaktoren hervorgerufenen Zellapoptose [38]. Eine Überexpression von *HAS-2* steigert demgegenüber das Tumorstadium [39]. Zudem konnte festgestellt werden, dass eine *Has-2*-Defizienz im Mausmodell durch eine dysfunktionelle kardiale Entwicklung embryonal letal verläuft [40]. Für die *Has-3* wurde eine wichtige Funktion im Extrazellulärraum des Gehirns am Mausmodell beschrieben, bei der eine *Has-3* Defizienz für ein erhöhtes Krampfanfallpotential prädisponierte [41]. Darüber hinaus ging eine *Has-3* Defizienz am Mäusemodell mit einer verbesserten Resistenz gegenüber Ventilations-induzierten Lungenerkrankungen einher [42]. Andere Studien konnten zeigen, dass eine *Has-1/-3* Doppeldefizienz eine gesteigerte dysfunktionellen Wundheilung bedingt [38]. Eine aktuelle Arbeit von Kessler *et al.* beschreibt eine verstärkte *Has-3* Expression in der Dextranatriumsulfat (DSS)-induzierten Kolitis am Mausmodell [43].

1.2.3 Hyaluronsäure-Degradation

Der Abbau bzw. die Fragmentierung von HA erfolgt einerseits unter Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies, die im Rahmen von Gewebeverletzungen den Abbau von Extrazellulärmatrix (EZM)-Komponenten wie HA, Kollagen oder Laminin katalysieren [44], zum anderen über spezifische Hyaluronidasen (HYAL) [45].

Die HYAL-1 liegt intrazellulär vor und katalysiert als lysomales Enzym den Abbau von HMW-HA zu kleinen HA Fragmenten, vorzugsweise Tetrasacchariden [46]. Die HYAL-2 ist plasmamembrangebunden und hydrolisiert HMW-HA zu mittellangkettigen HA-Molekülen mit einem Molekulargewicht von 20 kDa bzw. 50 Disaccharideinheiten [47] (Abb. 1). Eine

Degeneration von HMW-HA kann unter Beteiligung von CD44 (*cluster of differentiation 44*) [45] oder aber CD44-unabhängig über das KIA1199 Protein [48] erfolgen.

1.2.4 Hyaluronsäure-Rezeptoren

Die vielfältigen Funktionen der HA beruhen zum Großteil auf einer direkten Interaktion und Aktivierung spezifischer HA-Rezeptoren wie CD44 [49] und RHAMM (*Hyaluronan-mediated motility receptor*). CD44 wird von den meisten Zelltypen exprimiert (Abb. 1) [49] und ist über die Bindung von HA an Leukozyten über deren Aktivierung an Inflammation, T-Lymphozyten-Rekrutierung und an Tumorwachstum und Metastasierung beteiligt [50]. Weiterhin erfolgt der Abbau von HA CD44-abhängig, indem diese von Makrophagen internalisiert und zu niedermolekularem HA abgebaut wird. RHAMM ist maßgeblich an der HA-abhängigen Zelllokomotion beteiligt [51]. Es wurde gezeigt, dass eine RHAMM-Defizienz mit einer gestörten Wundheilung einhergeht [52]. Interessanterweise wird eine CD44-Defizienz durch RHAMM kompensiert, indem RHAMM HA-Bindung, Zellmigration und Hochregulation von inflammatorischen Genen anstelle von CD44 vermittelt [51].

1.2.5 Pharmakologische Beeinflussung der Hylauronsäure-Synthese

Zur Untersuchung der Einflüsse einer HA-Matrix wird seit längerem eine pharmakologische, Nicht-Isoenzym-spezifische Inhibition der HA-Synthese mittels 4-Methylumbelliferon (4-MU) genutzt [53]. 4-MU ist ein Cumarinderivat, welches jedoch keine antikoagulierende Wirkung wie das strukturell verwandte Phenprocoumon hat. Die hemmende Wirkung erfolgt, indem 4-MU als kompetitiver Agonist der Uridintriphosphat-abhängigen Glucosyltransferase den Pool an aktivierten Vorläuferzuckern (UDP-GlcUA) reduziert und so die Polymerisation von HA-Ketten stoppt. Zudem reduziert 4-MU die Expression von *Has-2* und *-3* mRNA (*messenger ribonucleic acid*), wobei der genaue Mechanismus jedoch nicht bekannt ist [54]. 4-MU wurde in Deutschland unter dem Handelsnamen Cholspasmin[®] therapeutisch bei Gallenblasenstörungen aufgrund seiner choleretischen Wirkungen genutzt [55, 56]. Diese Wirkung beruht wahrscheinlich auf seiner Strukturverwandtschaft zum spasmolytischen Papaverin [57]

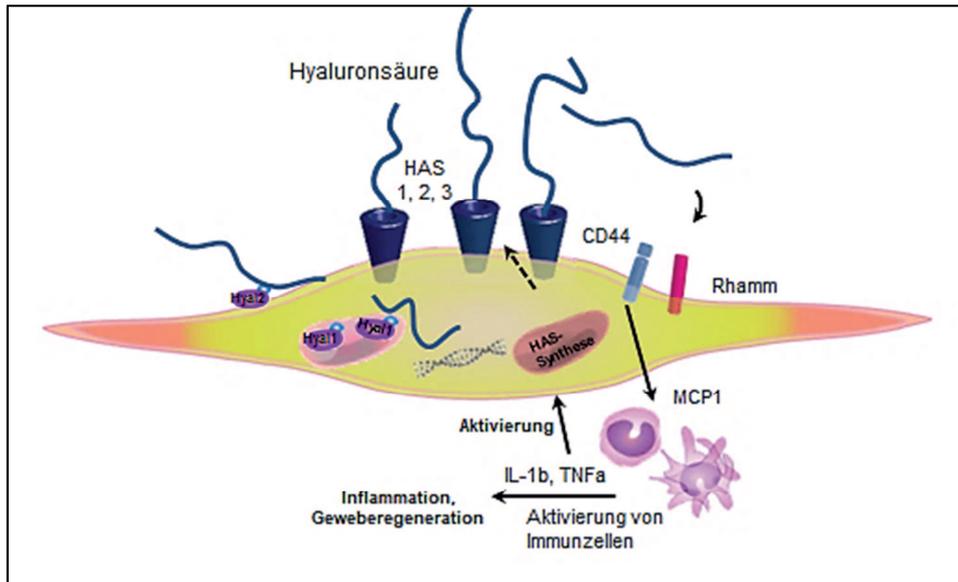


Abbildung 1: Schematische Darstellung des HA-Systems: In Anlehnung an die Darstellung von J. Müller et al. [58]

Hyaluronsäure (HA) wird über membranständige Hyaluronsäuresynthasen (HAS) von verschiedenen Zelltypen produziert. Dabei werden die sich bildenden HA-Polymere über Porenstrukturen in den Extrazellulärraum entlassen. Der Abbau von HA wird u.a. über spezifische Hyaluronidasen (HYAL) katalysiert. HYAL-1 liegt intrazellulär vor; HYAL-2 ist plasmamembrangebunden. Die Bindung und Signaltransduktion von HA erfolgt über verschiedene Rezeptoren wie RHAMM und CD44. Extrazellulär erfolgt eine Bindung und Quervernetzung von HA über verschiedene Hyaladhärine wie z.B. Versican oder TNF-stimuliertes Gen 6/Inter α Inhibitor (TSG6/Id1).

1.3 Hyaluronsäuresystem und chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.3.1 Hyaluronsäure

Bereits seit einigen Jahren rückt das HA-System als modulierender Faktor der Entwicklung und des Schweregrades von CED in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. In wissenschaftlichen Arbeiten wird dabei die akute Kolitis mittels DSS-Trinkwassergabe in Mausmodellen induziert [59].

Der genaue Wirkmechanismus von DSS ist nicht bekannt, jedoch wird eine direkt toxische Schädigung der Darmepithelien innerhalb der basalen Krypten sowie ein negativer Einfluss auf die Integrität der Schleimhautbarriere mit nachfolgender Bakterieninvasion als ursächlich vermutet [59, 60].

In früheren Studien zur akuten DSS-induzierten Kolitis [26, 61, 62] und Experimenten an humanen glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) sowie intestinalen mikrovaskulären Endothelzellen (*intestinal microvascular endothelial cells*, HIMEC) konnte eine verstärkte Akkumulation von HA im inflammatorischen Gewebe bei CED beobachtet werden [63]. Diese HA-Akkumulation wurde insbesondere innerhalb der Submukosa und *Lamina propria* beschrieben [43]. Dabei konnte eine vermehrte Leukozyten-Bindung an HA-

Kabeln beobachtet werden [63], welche über CD44 stabilisiert wird und einen proinflammatorischen Effekt hat [61, 63]. Auf der anderen Seite wurden aber auch antiinflammatorische Effekte durch hochmolekulare HA im Rahmen von Kolitis-Modellen beschrieben [64]. Die protektive Wirkung von HA soll hierbei über eine direkte TLR-4-Signaltransduktion erfolgen und einen Einfluss auf die Reparaturmechanismen von epithelalem Kolongewebe haben [62].

HA wird im Darm von verschiedensten Zelltypen wie glatten Muskelzellen und mikrovaskulären Endothelzellen [26], aber auch von Immunzellen produziert [62]. Dadurch ist HA an der Regulation immunologischer Prozesse beteiligt [26, 43, 62].

1.3.2 Rezeptoren

Über die Beeinflussung von Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktion [65] spielt CD44 im Rahmen der CED eine wichtige Rolle [63]. Zudem ist CD44 an der Wanderung von Immunzellen entlang von HA-Kabeln beteiligt und vermittelt die Adhäsion von T-Helferzellen-1 und -2 im entzündeten intestinalen Gewebe [65, 66] sowie die Extravasation von Leukozyten [67].

Bisher liegen keine Studien vor, die den Einfluss von RHAMM und die Interaktion mit HA im Rahmen der Kolitis beschreiben. Ebenso wenig ist der Einfluss von RHAMM auf die T-Zellfunktion im Kontext der CED bekannt.

1.3.3 Hyaluronsäuresynthesen-Expression

Bislang wurde eine verstärkte Regulation der einzelnen HAS-Isoenzyme im Rahmen der CED kontrovers diskutiert [26, 61, 68]. In einigen Studien wurde eine gesteigerte *Has-3* und auch *Has-2* mRNA-Expression beobachtet. Diese wurden lediglich in einzelnen Zellpopulationen, wie Makrophagen [62, 68] oder intestinalen mikrovaskulären Endothelzellen, nachgewiesen [26]. Zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit veröffentlichten Kessler *et al.* eine Arbeit, die eine reduzierte intestinale Inflammation und Gewebeerstörung in *Has-3* defizienten Mäusen nach DSS-induzierter Kolitis zeigt und somit eine direkte kausale Rolle dieses Isoenzym belegt [43]. Dabei bleibt der konkrete Einfluss einer HAS-Expressionsveränderung auf den Verlauf der CED sowie die beteiligten Zellpopulationen ungeklärt. Ebenso sind die möglichen pro- und antiinflammatorischen Effekte einer modulierten HA-Matrix noch unklar. Bisher liegen keine Studien vor, die den Einfluss einer HA-Synthesehemmung als pharmakologisch-therapeutischen Ansatzpunkt untersuchen.

1.3.4 Ziel

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Gewinnung detaillierter Einblicke in die kausale Rolle der HA-Synthese in der Pathogenese der CED und ihr Einfluss auf die Immunzellinvasion in das entzündete Darmgewebe im murinen Model der DSS-induzierten Kolitis mittels

- (I) eines *Has-3*-spezifischen *Knockouts* sowie
- (II) einer pharmakologischen, Nicht-Isoenzym-spezifischen Hemmung der HA-Synthese durch 4-MU.

2 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen die Effekte einer spezifischen *Has-3* Defizienz (*Knockout*, KO) auf die DSS-induzierte Kolitis untersucht werden. Vergleichend soll darüber hinaus die pharmakologische, Nicht-Isoenzym-spezifische Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU als mögliche therapeutische Option analysiert werden. Hierzu wird der Schweregrad der sich entwickelnden akuten Kolitis anhand makroskopischer und histologischer Parameter beurteilt.

Auch Veränderungen weiterer EZM-Komponenten, sowie unterschiedliche, am inflammatorischen Geschehen beteiligte Zellpopulationen, sollen hinsichtlich ihrer Einbindung in eine HA-vermittelte Antwort beurteilt werden. Schließlich wird die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine im Rahmen der akuten Kolitis untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen zu Gewebepräparation und Histologie

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
10% Formalin nach Lilie (Gewebefixierung)	46 mM Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) 29 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O
Ethanol absolut (Gewebefixierung)	gebrauchsfertig von Merck KGaA, Darmstadt
Aceton (Gewebefixierung)	gebrauchsfertig von Merck KGaA, Darmstadt
20x PBS	2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 1,5 mM NaCl 8,3 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4
3% H ₂ O ₂ /PBS	1:10 aus 30% H ₂ O ₂ und 1xPBS gebrauchsfertig von Merck KGaA, Darmstadt
ABC-Puffer (Chondroitinase-Verdau)	109 mM Tris-HCl 15% BSA 18 mM Na-Acetat pH 8,0
1% HCl	1:10 aus 10% HCl gebrauchsfertig von Applichem GmbH, Darmstadt

Tabelle 2: Verwendete Blockierlösungen zur Gewebepräparation und Histologie

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
Tris-HCl	Trispuffer 0,5 M 10% HCl pH 7,6
10x TBS	100 mM Tris/HCl 1,5 mM NaCl pH 7,4
1% BSA (in 1x PBS)	BSA gebrauchsfertig von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
10% FCS	gebrauchsfertig von Gipco, Thermo Fisher Scientific, Erlangen
Avidin-Biotin-Block	gebrauchsfertig von Thermo Fisher Scientific, Erlangen

3.1.2 Farbstoffe und Farblösungen

Tabelle 3: Verwendete Farbstoffe und Farblösungen

Farbstoff	Färbelösung
Hämalaun nach Mayer	gebrauchsfertig von Merck KG aA, Darmstadt
Eosin 1%	gebrauchsfertig von Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

3.1.3 Substanzen und Arzneistoffe

Tabelle 4: Verwendete Substanzen in der Genexpressionsanalyse

Substanz	Hersteller
Flüssiger Stickstoff (N ₂)	Linde, München
Oligonukleotide	Invitrogen, Carlsbad, USA
10 mM dNTP-Mix	Merck KG aA, Darmstadt
qPCR Supermix	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tabelle 5: Verwendete Substanzen in der Histochemie

Substanzen	Hersteller
Aquatex	Merck KG aA, Darmstadt
Diaminobenzidin (DAB)	Zytomed Systems, Berlin
Roti-Mount (Eindeckmedium)	Roth, Karlsruhe
KP-Cryocompound (Kryoprotektion)	Klinikpath BV, Niederlande
Chondroitinase (2U/100µl)	Sigma-Aldrich, ST. Louis, USA
DSS Salz (36.000-50.000 Da)	MP Biomedicals, Eschwege

Tabelle 6: Verwendete Arzneistoffe

Wirkstoff	Arzneimittel-Name
4-Methylumbelliferon (4-MU)	Hymecromon, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.4 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
rabbit anti-Biglykan LF 159, polyklonal	Von Larry Fisher (NIH (<i>National Institutes of Health</i>), Maryland, USA) zur Verfügung gestellt	1:200
rat anti-CD45	BD Biosciences, San Jose, USA	1:50
rabbit anti-Decorin LF 113, polyklonal	Von Larry Fisher (NIH, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt	1:200
rat anti-F4/80	AbD Serotec, Puchheim	1:100
Fab Fragment, <i>goat anti mouse</i> IgG	Rockland Immunochemicals, Limerick, PA	1:25

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper in der Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
<i>Goat anti-rabbit</i> IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	1:400 (Decorin, Biglykan)
<i>Goat anti-rat</i> IgG HRP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	1:200 (CD45), 1:400 (F4/80)

Tabelle 9: Verwendete Bindeproteine

Bindeprotein	Hersteller	Verdünnung
Hyaluronsäurebindeprotein (HABP) biotinyliert	Calbiochem, San Diego, USA	1:100
Streptavidin Peroxidase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	1:200 (HA)

3.1.5 Screening-Test

Tabelle 10: Verwendeter Screening-Test

Material	Firma, Sitz
Hämoculttest	Hemo Care, Fresenius AG, Hilden

3.2 Methoden

Die Etablierung, Haltung und Versorgung der Versuchstiere, sowie Gewinnung der Proben zur histologischen und genexpressorischen Analyse wurde durch Kollegen und Mitarbeiter des Institutes für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Universität Düsseldorf durchgeführt.

3.2.1 Tiere und Futter

Zunächst wurden ubiquitäre *Has-3* KO Mäuse (Genoways, Lyon, Frankreich) [69] auf C57BL/6J Hintergrund und die zugehörigen Wildtyp (WT) Geschwistertiere hinsichtlich der Entwicklung und des Verlaufs der akuten Kolitis untersucht. Zudem wurden C57BL/6J Wildtypmäuse (WT; Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) mit einem pharmakologischen Inhibitor der HA-Synthese (4-Methylumbelliferon; 4-MU) bzw. Placebo-Futter behandelt und wiederum die Entwicklung und der Verlauf der akuten Kolitis analysiert. Alle Tiere wurden im zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen bzw. in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (Aktenzeichen des LANUV: 87-51.04.2010.A142) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Für die Experimente wurden Männchen im Alter von 6-12 Wochen gewählt, da diese, basierend auf Literaturangaben, besonders sensitiv auf die DSS-Behandlung ansprechen [70, 71] und homogene Versuchsergebnisse zeigen [72].

Die unterschiedlichen Versuchsgruppen wurden in konstantem 12 Stunden Tag- und Nachtrhythmus gehalten. Futter und Wasser wurden *ad libitum* verabreicht.

3.2.1.1 Futtermischungen

Alle Tiere erhielten bis zum Versuchsbeginn eine Standard-*Chow*-Diät. Anschließend erfolgte in einigen Versuchsgruppen die Verwendung einer speziellen Placebo-Futtermischung (Ssniff, S7200) bzw. eine Futtermischung mit Beimischung von 4-MU (50 g/kg Futter). Dabei galt der mittlere Futtermittelfverbrauch von 5 g Futter/Maus/Tag als Grundlage für die kalkulierte Arzneistoffdosierung von 250 mg/Maus/Tag.

3.2.1.2 Dextranatriumsulfat-induzierte Kolitis

Zur Induktion der akuten Kolitis [73] wurde DSS mit einem Molekulargewicht von 36.000-50.000 Da eingesetzt. Zur Herstellung einer 2%igen Lösung wurden 2 g DSS in 100 ml autoklaviertem Wasser gelöst, da sich diese Konzentration als optimal zur Induktion einer moderaten Kolitis nach Literaturangabe und in vorangegangenen Experimenten erwiesen hatte [72].

3.2.3 Bewertung der akuten Kolitis

3.2.3.1 Gewichtsverlauf

Zur Beurteilung des Gewichtsverlaufes unter DSS diente jeweils das Gewicht der DSS unbehandelten Kontrollgruppe an Tag 1 als Bezugspunkt. Dabei wurde das mittlere Ausgangsgewicht (1. Behandlungstag) der jeweiligen DSS unbehandelten Kontrollgruppe (Placebo/4-MU/WT/Has-3 KO) als Referenzwert von 100% festgesetzt. Und das Gewicht der entsprechenden DSS-behandelten Gruppe wurde als prozentuale Abweichung vom Ausgangswert der Kontrollgruppe dargestellt. Der Gewichtsabfall dokumentierte hierbei die Schwere der induzierten Kolitis.

Zur Bestimmung des Gewichtsverlaufes der Mäuse unter DSS-Behandlung wurden die Tiere am 1. Tag des Versuchs, sowie im Verlauf ab dem 4. Tag täglich auf einer Minimalwaage (EMB 500-1. Kern&Sohn GmbH, Balingen) gewogen. Alle Tiere erhielten im Versuchsverlauf gleichen Zugang zu Futter und Trinkwasser.

3.2.3.2 Makroskopische Veränderungen

Auf makroskopischer Ebene wurden Kolonlänge und -gewicht erfasst. Dazu wurde das Kolon direkt nach der Organentnahme vermessen und gewogen. Die Gesamtlänge des Kolons wurde vom ileozökalem Übergang bis zum Rektum bestimmt. Zusätzlich wurden die relativen Kolongewichte, welche sich aus dem Verhältnis von Kolongewicht zu Kolonlänge ergeben, verglichen. Der Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe wurde dabei auf 100% gesetzt und die prozentuale Abweichung der jeweiligen Behandlungsgruppe damit verglichen.

3.2.4 Präparation der Mäuse zur weiteren Analyse

Die Organentnahme erfolgte je nach Versuchsgruppe am 5. bzw. 7. Tag. Der Bauchraum wurde mittels eines medianen Schnittes geöffnet und es erfolgte die Darmentnahme (siehe 3.2.4.1). Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Um eine Degradierung der Ribonukleinsäure (RNA) durch RNAsen zu vermeiden, wurde die Präparation und Gewinnung der RNA-Proben innerhalb weniger Minuten vorgenommen. Zudem wurde ein steriles, RNase-freies Besteck (Aesculap AG, Tuttlingen) verwendet um eine Degradierung der RNA auszuschließen. Die Präparation und Organentnahme erfolgte durch Mitarbeiter des Institutes für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Universität Düsseldorf.

3.2.4.1 Dickdarmentnahme und -aufbereitung

Der Dickdarm wurde wie oben beschrieben zwischen dem ileozökalem und rektalem Übergang abgesetzt. *Ex situ* wurde der Darm auf eine Objektplatte mit sterilem 1xPBS auf Eis überführt und von restlichem noch anhaftendem Bindegewebe und Fett vorsichtig befreit und anschließend gemessen und gewogen (Minimalwaage, EMB 500-1. Kern&Sohn GmbH, Balingen). Es erfolgte eine Trennung des Dickdarms in drei Teile: ein proximaler, medialer und distaler Darmabschnitt. Dadurch konnten die Kolonabschnitte getrennt ausgewertet

werden. Jeder Dickdarmabschnitt wurde halbiert, um separate Abschnitte für die histologische und die Genexpressions-Analyse zu erhalten. Die eine Darmhälfte wurde in flüssigem Stickstoff kältefixiert und bis zur weiteren RNA-Analyse bei -80°C gelagert. Die andere Darmhälfte wurde nativ in eine mit KP-Cryocompound-Einbettmedium (Klinik Path, Belgien) gefüllte Kryoform mittig platziert und eingebettet. Es wurde darauf geachtet, dass das Darmlumen senkrecht zur Schnittfläche steht, um bei der histologischen Aufarbeitung Querschnitte des Darmlumens zu erhalten. Bis zur Anfertigung der Schnitte wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Auswertung von histologischem Material

3.2.5.1 Gefrierschnitte

Um Risse in den Gewebeproben zu vermeiden, wurden die Blöcke eine halbe Stunde vor dem Schneiden bei -20 °C im Kryostaten (Leica CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar) aufgetaut. Anschließend wurden 20-30 14 µm dicke aufeinanderfolgende Schnitte vom distalen Kolonabschnitt angefertigt. Dabei wurden jeweils zwei Schnitte auf einem Objektträger in gleicher Orientierung aufgezogen. Bis zur Färbung wurden die Schnitte unter Ausschluss von Feuchtigkeit bei -20 °C gelagert. Direkt vor dem Anfärben wurden die Schnitte eine Stunde bei Raumluft äquilibriert, um Risse im Gewebe beim Auftauen zu vermeiden.

3.2.6 Histologische Analyse des Schweregrades der Kolitis

3.2.6.1 Hämalaun-Eosin (HE) Färbung

Die Gefrierschnitte wurden in kaltem 10% Formalin für 20 Minuten bei 4 °C nachfixiert. Die Kerne wurden mit Hämalaun nach Meyer angefärbt. Anschließend wurde das Gewebe mit 1% Eosinlösung behandelt, um das Zytoplasma anzufärben. Mit Hilfe dieser Doppelfärbung ergab sich eine histologische Übersichtsdarstellung distaler Kolonabschnitte. Die Schnitte wurden nach der Behandlung einer aufsteigenden Alkoholreihe mit Roti®-Mount (Carl Roth, Karlsruhe) eingedeckt.

3.2.6.2 Histologische Beurteilung des Schweregrades der Kolitis

Zur Beurteilung histologischer Veränderungen in Abhängigkeit vom Schweregrad der Kolitis wurden die HE-Übersichtsfärbungen lichtmikroskopisch (Axio Imager. M2; Axio Vision SE 64 Rel.4.9.1, Zeiss, Göttingen) untersucht. Mit Hilfe eines modifizierten Punktesystems nach Lahat *et al.* [74] wurden die einzelnen Schnitte anhand der in Tabelle 11 aufgeführten Parameter beurteilt. Diese sind nach Kolitis-spezifischen histologischen Veränderungen gewählt worden.

Der Aufbau der Dickdarmwand ist durch eine typische Dreiteilung gekennzeichnet, die sich in Mukosa, Submukosa und Muskularis gliedert (Abb. 4). Die Mukosa wiederum gliedert sich in

eine *Lamina epithelialis mucosae* mit Oberflächen- und Kryptenepithelien, eine *Lamina propria* aus lockerem Bindegewebe und einer *Lamina muscularis mucosae*, aus dünnen glattmuskulären Fasern (Abb. 5). Das Epithel wirft tiefe Krypten und enthält viele Becherzellen, die einen Schleimfilm auf der Darmoberfläche bilden. Innerhalb der *Lamina propria* befinden sich die Immunzellen, die unter physiologischen Bedingungen nur vereinzelt vorhanden sind. Der Mukosa schließt sich die gefäßführende Submukosa aus Bindegewebsfasern an, die im Vergleich zur menschlichen Submukosa wesentlich dünner ausgeprägt ist. Die nach außen gelegene Muskularis besteht aus einer dickeren längs- und dünneren quermuskulären Schicht. Die Dickdarmwand ist gekennzeichnet durch Bildung von großen Falten, die das Lumen physiologisch sternförmig konfiguriert darstellt. In den Abbildungen 4 und 5 ist die histologische Architektur der Dickdarmwand exemplarisch dargestellt.

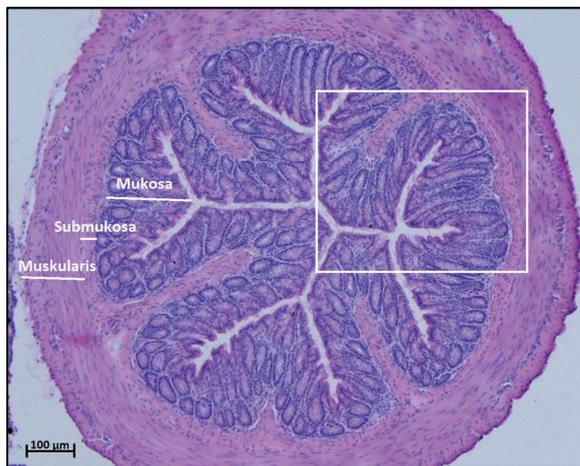


Abbildung 4: Histologischer Darmquerschnitt

Deutlich ausgeprägte sternförmige Lumenkonfiguration durch hoch aufschlagende Falten. Dargestellt ist die gesamte Darmwand (GDW) bestehend aus Mukosa (M), Submukosa (SM) und Muskularis (Mk). Maßstabsbalken 100 µm.

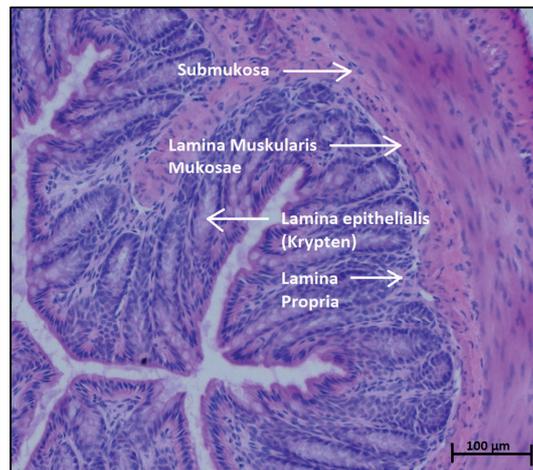


Abbildung 5: Ausschnittsvergrößerung der Mukosa

Darstellung der drei Mukosa (M)-schichten, bestehend aus *Lamina epithelialis*, *Lamina propria* (LP) und *Lamina muscularis mucosae* (LMM). Es liegen physiologisch tiefe Krypten vor. Maßstabsbalken 100 µm.

Um entsprechende histologische Veränderungen im Rahmen der DSS-induzierten akuten Kolitis in den einzelnen Versuchsgruppen zu untersuchen, wurden die HE-Übersichtsfärbungen der einzelnen Versuchsgruppen lichtmikroskopisch mit Hilfe eines histologischen Kolitis-Punktescores (Tabelle 11) beurteilt. Je höher die Punktesumme des Kolitis-Punktescores, desto stärker war der Schädigungsgrad zu bewerten.

Tabelle 11: Histologischer Kolitis-Punktescore.

Punktwerte der einzelnen Beurteilungskriterien nach histologischem Befund, sowie die detaillierte Beschreibung der Beurteilungskriterien. LMM (*Lamina muscularis mucosae*), GDW (gesamte Darmwand), SM (Submukosa), Mk (Muskularis), M (Mukosa), LP (*Lamina propria*), Bindegewebe (BGW).

Parameter	Punkte	Beschreibung
Kryptentiefe	0: normal 1: leicht abgenommen 2: stark abgenommen 3: nicht beurteilbar	Bis LMM Auf 2/3 M bis 10% der GDW Auf 2/3 M mehr als 10% der GDW oder auf 1/3 M Völliger Verlust der Kriptenstruktur
Kriptenstruktur	0: normal 1: vereinzelt entformt 2: mäßig entformt 3: stark entformt	tubulär, scharf abgrenzbarer geschlossener Zellverband bis 10% der GDW 10-70 % der GDW >70% der GDW
Submukosa	0: normal 1: verbreitert 2: +Absetzung	kompakt, sehr dünn, schwer abgrenzbar BGW/Zellen vermehrt, aufgelockerte SM + Absetzung SM und Mk
Zelluntergang	0: physiologisch 1: gering gesteigert 2: stark apoptotisch 3: komplett zerstört	kompaktes Gewebe, Zellzusammenhalt, Homogenität Oberflächenepithel verstärkt abgelöst M apoptotisch, keine klare Abgrenzung Epithelien GDW zerstört
Einwanderung von mononukleären Zellen in LP	0: nicht vermehrt 1: leicht 2: mäßig 3: stark	LP sehr dünn, keine klare Abgrenzung MM LP umgibt komplett basalen Anteile E innerhalb GDW LP Verbreiterung bis 10% LP Verbreiterung mehr als 10%
Follikel	0: Nicht vorhanden 1: < 2 2: > 2	

Jedes Präparat wurde durch drei unabhängige Auswerter bezüglich der einzelnen Behandlungsgruppen verblindet beurteilt. Färbe-, Schnitt- und Fixierungsartefakte wurden berücksichtigt, so dass eine präparationsbedingte Fehlbeurteilung weitestgehend vermieden wurde.

3.2.7 Histologische Analyse der Extrazellulärmatrix-Komponenten und der inflammatorischen Zellen

3.2.7.1 Immunhistochemische Färbungen

Die Gefrierschnitte wurden entsprechend der jeweiligen Färbung für 20 min bei 4 °C fixiert. Bei allen Färbungen wurden allgemein unspezifische Bindungsstellen mit einer 10x 10% TBS (Tris gepufferte Kochsalzlösung), 10% FCS (*fetal calf serum*, Fötales Kälberserum) und 1% BSA (Bovines Serumalbumin) Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt, um den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren. Der obere der beiden Schnitte auf einem Objektträger wurde mit dem Primär-Antikörper (AK) über Nacht bei 4 °C

inkubiert, der andere als Negativkontrolle verwendete Schnitt wurde mit 1% BSA (Bovines Serumalbumin) Pufferlösung feucht gehalten. Zur Blockierung endogener Peroxidasen wurden die Schnitte mit 3% H₂O₂/PBS-Lösung (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) abgesättigt. Die Detektion erfolgte mit einem entsprechenden HRP (*horseradish peroxidase*)-konjugierten Zweit-AK durch eine Peroxidase-katalysierten Farbreaktion mit DAB (Diaminobenzidin). Die Kerne wurden anschließend mit Hämalaun nach Meyer angefärbt. Nach Behandlung wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe und mit dem Intermedium Roticlear mit Roti-Mount eingedeckt.

Zum allgemeinen Nachweis von Leukozyten wurde ein Primär-AK gegen CD45 verwendet. Die entsprechenden Schnitte wurden zunächst mit Aceton fixiert. Der Blockierlösung folgte ein 30-minütiger Fab-Block (*antigen binding fragment*) zur Absättigung unspezifischer Fc- (*fragment crystallizable*) Bindungsstellen im Gewebe. Als Zweit-AK diente ein *anti-rat* IgG (Immunglobulin) HRP-konjugierter AK.

Makrophagen wurden mit Hilfe eines F4/80 Primär-AK nachgewiesen. Schnitte dieser Färbung wurden mit 10% Formalin fixiert. Auch hier wurde nach allgemeiner Blockierung ein 30-minütiger Fab-Block angewandt. Als Zweit-AK wurde ein *anti-rat* IgG HRP-konjugierter AK verwendet.

HA wurde mittels biotinyliertem HA-Bindeprotein angefärbt. Nach Acetonfixierung wurde das Gewebe mit einem Avidin-Biotin-Block nach Herstellerprotokoll behandelt, um endogenes Biotin zu blockieren. Für das HA-Bindeprotein wurde zur Detektion eine Streptavidin-gekoppelte Peroxidase verwendet.

Zur Anfärbung der Proteoglykane Biglykan und Decorin wurden die Schnitte mit 10% Formalin fixiert. Um das Gewebe für die Primär-AK von Larry Fischer, die am Kernprotein der jeweiligen Proteoglykane binden, zugänglich zu machen, wurden die Schnitte mit gelöster Chondroitinase für eine Stunde in einem 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Nach Blockierung und Inkubation mit dem Primär-AK wurden die Proteine mittels *goat anti-rabbit* HRP-gekoppelten Zweit-AK angefärbt.

3.2.7.2 Mikroskop

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Mikroskop mit Axio Kamera (Axio Imager. M2; Axio Vision SE 64 Rel.4.9.1, Zeiss, Göttingen) angefertigt.

Für die HE und immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden Bilder in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen. Neben einem Übersichtsbild dienten jeweils drei möglichst überschneidungsfreie Detailaufnahmen, mit einem 20er- Objektiv, zur späteren quantitativen Beurteilung der angefärbten Zielstrukturen innerhalb eines distalen Kolonpräparates. Die

Histologie des Kolons wurde anhand HE-gefärbter histologischer Schnitte mittels des Kolitis-Punktescores (Tabelle 11) beurteilt.

3.2.7.3 Quantitative Auswertung mittels Image J

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mittels Image J Software (MIH, Maryland, USA) ausgewertet. Die Zielstrukturen wurden innerhalb der Schicht der Kolonwand, in der sie auftreten, in den jeweiligen Detailaufnahmen ausgewählt, wodurch eine quantitative Aussage über ihr Vorkommen gemacht werden konnte. Die EZM-Komponenten HA, Biglykan und Decorin wurden innerhalb der Submukosa, Makrophagen und Leukozyten als Inflammations-modulierende Zellen innerhalb der Mukosa beurteilt.

Indem die Farbkanäle für die Kernfärbung und unspezifischer Hintergrundfärbung von denen für die jeweilige Zielstruktur getrennt wurden, konnte das Farbsignal der Zielstruktur einzeln quantitativ ausgewertet werden. Für die angefärbten Bereiche wurde manuell ein Schwellenwert für die jeweilige Färbung festgelegt, der für alle Schnitte einer Färbung beibehalten wurde. Dieser deckte im Mittel alle Schnitte einer Färbung ab, wobei alle Werte unterhalb des Schwellenwerts eliminiert wurden.

In der Analyse wurde die Menge des angefärbten Bereiches bei durch den Schwellenwert gegebener Intensität auf die Gesamtfläche bezogen und lieferte den Wert der *Area fraction*. Für jedes Präparat wurden die drei Ausschnitte separat ausgewertet und der Mittelwert gebildet.

3.2.8 Isolierung und Analyse von Ribonukleinsäure aus Dickdarm

3.2.8.1 Ribonukleinsäure-Isolierung

Die Isolierung von RNA erfolgte mittels RNeasy fibrous Tissue Kit[®] (Qiagen, Hilden) gemäß Angaben des Herstellers. Zunächst wurde das bei -80 °C gelagerte Kolongewebe mit Gewebeklopfen pulverisiert, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und abgewogen. Nachfolgend wurden maximal 30 mg Gewebe verwendet. Das pulverisierte Gewebe wurde zunächst in 10 µl Puffer (RLT Buffer) pro 1 mg Gewebe suspendiert und über Nacht bei -20°C eingefroren. Das entstehende Lysat wurde nach Herstellerprotokoll weiterbehandelt und in 25 µl DEPC- (Diethylpyrocarbonat-)Wasser resuspendiert.

3.2.8.2 Ribonukleinsäure-Quantifizierung

Der Reinheitsgrad der präparierten RNA wurde mit einem Photospektrometer (Nanodrop 1000, PeQLab, Erlangen) durch Bildung der Quotienten der Absorptionswerte der unterschiedlichen Wellenlängen (230/260 nm, sowie 260/280 nm) bestimmt. Die Konzentration der RNA wurde durch die Messung der Absorption bei 260 nm gemessen.

Die Qualität der Proben wurde mittels LabChip™ Technologie des Biologisch-medizinischem Forschungszentrums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf anhand der Bandenmuster und *Peak-Flow*-Kurven überprüft.

3.2.8.3 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde zunächst in doppelsträngige cDNA mittels Superscript II Reverse Transcriptase Kit® (Invitrogen, Carlsbad, USA) im PCR-Cycler (Primus 96, PeQLab, Erlangen) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 1000 ng RNA der Proben in insgesamt 10 µl DEPC-Wasser suspensiert und nach dem unten aufgeführten Herstellerprotokoll weiterverarbeitet.

Superscript II Reverse Transcriptase Kit Verlaufsprotokoll:

- 1) 1 µl Oligonukleotide, 1 µl 10 mM dNTP-Mix
- 2) 7 µl Mastermix: 4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M (molar) DTT ,
1 µl RNAsin (40 u/ µl Promega)
- 3) 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase

Superscript II Reverse Transcriptase Kit Temperaturprofil:

- 1) 5 Minuten; 65°C
- 2) 2 Minuten; 42°C
- 3) 50 Minuten; 42°C
- 4) 10 Minuten; 70°C

Zwischen den einzelnen Homogenisierungsschritten wurden die Proben auf Eis gelagert. Die umgeschriebene cDNA wurde im Anschluss mit 100 µl ultrafiltriertem Wasser verdünnt und bei 4 °C gelagert.

3.2.9 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (q-PCR)

Mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion erfolgt eine Vervielfältigung ausgewählter Nukleotidsequenzen. Mittels fluoreszierender Farbstoffe wurde die zeitliche DNA-Produktion verfolgt. Genspezifische Oligonukleotide, sogenannte *Primer*, werden verwendet, um die entsprechende Nukleotidsequenz zu markieren. Zudem dienen sie zur Anlagerung einer hitzestabilen sogenannten Taq- (*thermus aquaticus*-) Polymerase, die eine Verknüpfung angelagerter Basenpaare vornimmt. Die dadurch neu entstehenden Doppelstränge werden unter Hitze wieder voneinander getrennt (denaturiert) und dadurch neue Matrizen gebildet. Im Verlauf werden die einzelnen Zyklen aus Anlagerung, Synthese und Denaturierung bis zum Verbrauch zugefügter Basen wiederholt und die Produktmenge folglich exponentiell gesteigert. Das Expressionslevel wurde nach der $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Methode berechnet. Bei jeder Reaktion wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) als interner

Standard koamplifiziert. Die Durchführung der q-PCR (Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR-System, Applied Biosystems, Darmstadt) wurde durch Kollegen und Mitarbeiter des Institutes für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Universität Düsseldorf durchgeführt.

qRT-PCR Ansatz:

5 µl cDNA
 10 µl qPCR Supermix
 5 nM; 2,5 µl je Primer

Temperaturprofil

	Zeit	Zyklen	Vorgang
50°C	2 min	1x	
95°C	2 min	1x	Denaturierung
95°C	15 sek	40-60	Anlagerung
60°C	30 sek		Elongation

Tabelle 12: Verwendete Primer

Primer für qRT- PCR

Gen	Primer- Sequenz
<i>Gapdh</i>	5`TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC 3` 5`AAGATGGTGATGGGCTTCCCG 3`
<i>Tnf-α</i>	5`CGAGTGACAAGCCTGTAGCC 3` 5`AGCTGCTCCTCCACTTGGT 3`
<i>Il-1β</i>	5`GGATGAGGACATGAGCACCT 3` 5`CGTCACACACCAGCAGGTTA 3`
<i>Mcp-1</i>	5`CCCAATGAGTAGGCTGGAGA 3` 5`TCTGGACCCATTCTTCTTG 3`
<i>Hyal-1</i>	5`GAAATGACAGATTATCTTCTGCC 3` 5`TTGTCTGAGCTTAGCCAGAG 3`
<i>Hyal- 2</i>	5`GGTGGACCTTATCTCTACCAT 3` 5`TATTGGCAGGTCTCCATACTT 3`
<i>Rhamm</i>	5`GCAGAAGGAGGAGCAGAGTG 3` 5`GGCGTGAGCAGCAATATGT 3`
<i>Cd44</i>	5`GACCGGTTACCATAACTATTGTC 3` 5`CATCGATGTCTTCTTGGTGTG 3`
<i>Biglykan</i>	5`CTGAGGGAACTTCACTTGGGA 3` 5`CAGATAGACAACCTGGAGGAG 3`
<i>Decorin</i>	5`TAAAAGGTCGTGAAAATACAT 3` 5`GAAGTCAAATAAGCCTCTCTG 3`

Als endogenes Referenzgen diente *Gapdh*, so dass die relative Expression der Gene auf dieses normalisiert wurde.

3.2.10 Statistik

Die statistische Auswertung der einzelnen Experimente wurde mit GraphPad Prism 5-Software (Scinetific Software, San Diego, USA) vorgenommen. Die Messdaten wurden als Mittelwerte +/- Mittelwert des Standardfehlers (*standard error of the mean*, SEM) aus einer Anzahl von n unabhängigen Versuchen entsprechend der Versuchsgruppen angegeben. Zur Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen mehreren Versuchsgruppen (≥ 3) wurde eine *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) mit nachfolgendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche durchgeführt. Dabei wurde das Signifikanzniveau P für α mit 0,05 festgelegt. Das Konfidenzintervall lag bei 95%.

4 Ergebnisse

4.1 Hyaluronsäure-Expression bei einer isolierten *Hyaluronsäuresynthase-3* Defizienz

Mäusen mit einer ubiquitären *Has-3* Defizienz (*Has-3* KO) und WT Geschwistertieren wurde für 5 Tage DSS im Trinkwasser verabreicht, um die Effekte im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis auf die HA-Expression zu untersuchen. *Has-3* KO Tiere wiesen histologisch im Vergleich zu WT Tieren basal keine Veränderungen der HA-Akkumulation in den einzelnen Kolonschichten auf. Nach 5 Tagen DSS-Behandlung war es lediglich in der Submukosa bei WT Tieren mit einer Steigerung der HA-Verteilung um 150% zu einem Trend von mehr HA gekommen. Bei der *Has-3* KO Gruppe war eine Steigerung inhibiert (Abb. 6 B).

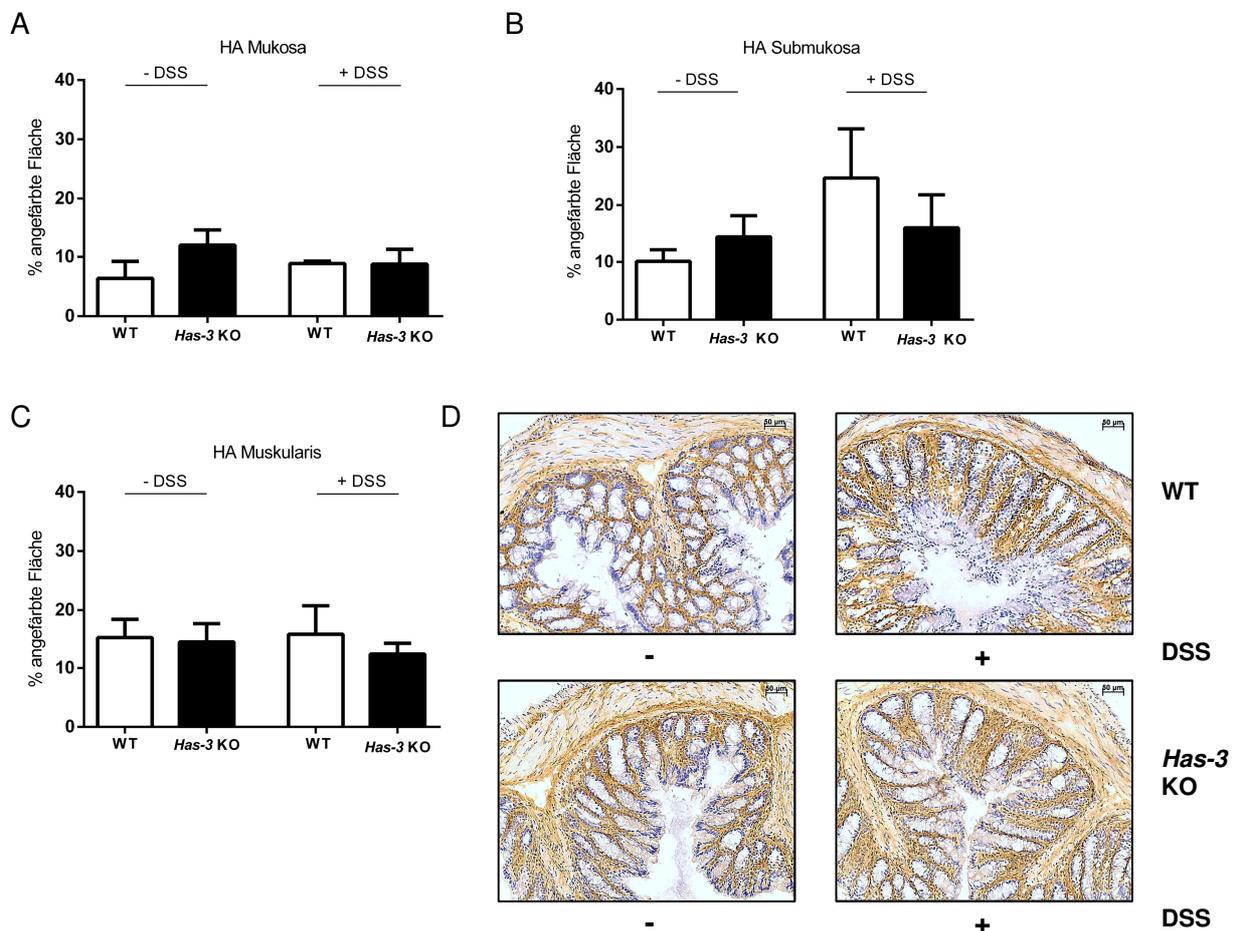


Abbildung 6: Verteilung von HA innerhalb der einzelnen Darmschichten der Kolonwand

(A-C) Quantitative Auswertung der HA-Färbung in (A) Mukosa (M), (B) Submukosa (SM) und (C) Muskularis (Mk) von WT und *Has-3* KO Tieren ohne und mit DSS-Gabe mittels ImageJ. (D) Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von HA, Maßstabsbalken: 50 μ m. In braun dargestellt HA, die Hämalaun-gefärbten Zellkerne in blau. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM. n= 5,7,3,7 (M), 5,6,3,6 (SM), 5,6,3,5 (Mk).

4.2 Einfluss einer isolierten *Hyaluronsäuresynthase-3* Defizienz auf den Schweregrad und die Ausprägung der akuten Kolitis

Im Weiteren sollten Auswirkungen des ubiquitären *Has-3* KO auf den Schweregrad der DSS-induzierten Kolitis untersucht werden. Beurteilt wurden hierzu Gewichtsverlauf sowie makroskopische und histologische Veränderungen der distalen Kolonabschnitte. Mittels immunhistochemischer Färbungen wurde die Einwanderung von Leukozyten und Makrophagen beurteilt. Als weitere EZM-Komponenten wurden die Expression von Biglykan und Decorin histologisch und auf mRNA Ebene untersucht.

4.2.1 Gewichtsverlauf

Bei den DSS behandelten WT Tieren fiel nach 5 Tagen im Vergleich zu unbehandelten Geschwistertieren ein signifikanter Gewichtsabfall von 5 % auf. Bei den *Has-3* KO Tieren war es dagegen zu keinem Gewichtsabfall unter der DSS-Behandlung gekommen (Abb. 7).

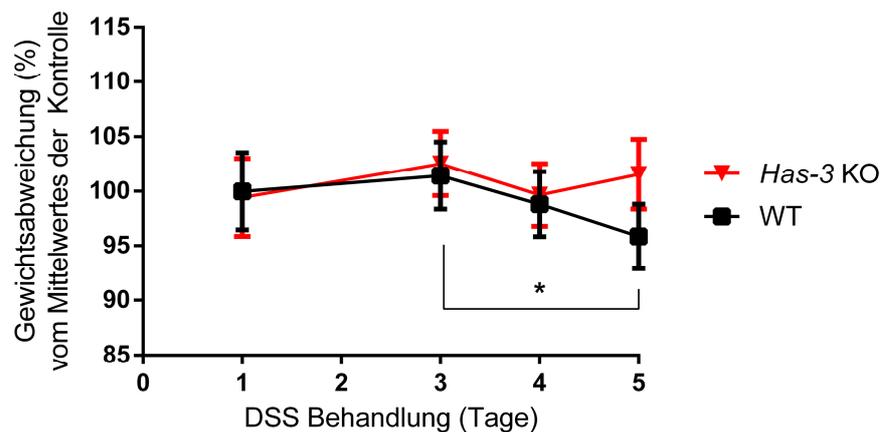


Abbildung 7: Gewichtsverlauf *Has-3*-defizienter Mäuse im Vergleich zu WT Geschwistertieren nach DSS-Behandlung

Dargestellt ist der Gewichtsverlauf der DSS-behandelten Gruppen als prozentuale Abweichung vom Ausgangsgewicht der jeweiligen Kontrolle ohne DSS-Behandlung an Behandlungstag 1 (=100%). Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM; *P <0,05; n=8-11.

4.2.2 Makroskopische Veränderung von Kolongewicht und -länge

Unter der DSS-Behandlung konnte eine signifikante Verkürzung des Kolons der WT Tiere als Zeichen einer manifesten Kolitis festgestellt werden. Hingegen zeigte die entsprechende Verkürzung des Kolons bei den *Has-3* KO Tieren unter DSS nur eine abnehmende Tendenz (Abb. 8 A). Sowohl bei den WT als auch bei den *Has-3* KO Tieren kam es zu einer signifikanten relativen Gewichtszunahme des Kolons unter DSS, es bestanden aber keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit oder ohne DSS-Behandlung (Abb. 8 B).

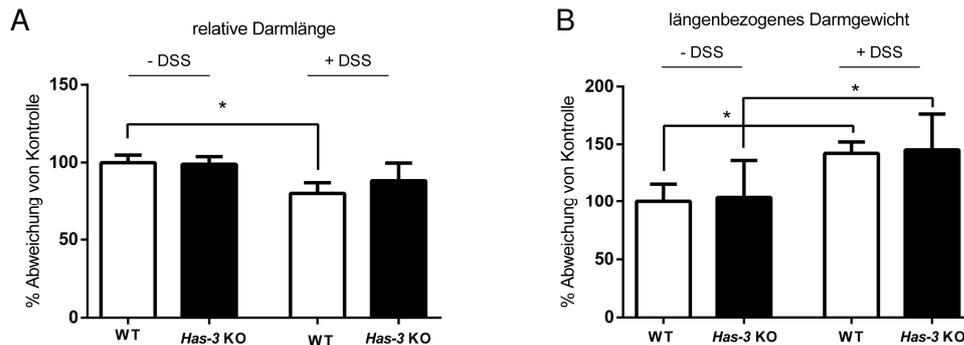


Abbildung 8: Veränderungen der Kolonlänge und des Kolongewichtes unter DSS-Behandlung.

(A) Auswertung der Kolonlänge und (B) des längenbezogenen Kolongewichtes nach DSS-Behandlung bei WT und *Has-3* KO Tieren. Dargestellt wird die prozentuale Abweichung der Kolonlänge und des längenbezogenen Kolongewichtes zur unbehandelten WT Gruppe. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM; *P < 0,05; n=6, 11, 7, 10.

4.2.3 Histologische Beurteilung der Darmstruktur

Unter DSS-Gabe kam es zu ausgeprägten Veränderungen der tubulären Kryptenstruktur, bei der sich der Epithelverband zunehmend auflockerte und unschärfer abzugrenzen war (Abb. 9 A-C). Die Tiefe der Krypten nahm stark ab. Durch einwandernde mononukleäre Zellen verbreiterte sich die *Lamina propria*, wodurch sie von der *Lamina muscularis mucosae* abzugrenzen war (Abb. 9 A, C, breiter Pfeil). In einigen Präparaten fielen auch charakteristische Lymphfollikel auf, die als pathognomonisches Zeichen der CU beschrieben werden (nicht dargestellt) [5]. Auch die Submukosa stellte sich als Zeichen einer schweren Kolitis verbreitert dar, indem sie an Gewebefasern und Zellen zunahm und stark auflockerte (Abb. 9 A, C, schmaler Pfeil). Als Zeichen einer allgemeinen Schädigung des Kolons kam es zum Zerfall von Zellen. Je höher die Schädigung fortschreitet, desto weiter breitet sich diese von luminal, nur das Kryptenepithel betreffend, bis auf die gesamte Darmwand aus.

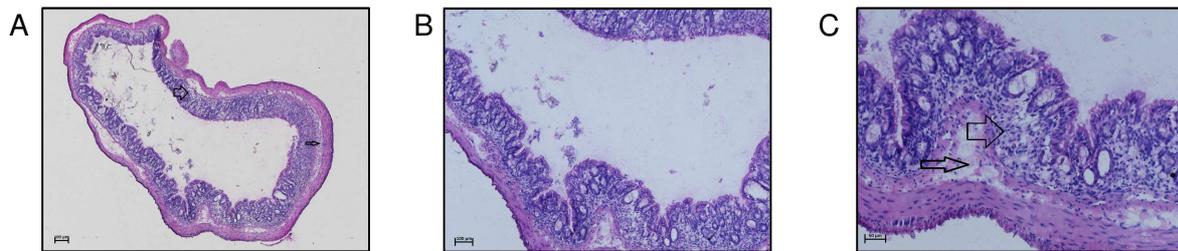


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung histologischer Veränderungen im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis

Darstellung der HE-Übersichtsfärbung distaler Kolonabschnitte in unterschiedlichen Vergrößerungen beurteilt. Verbreiterung der *Lamina propria*: breiter Pfeil; Verbreiterung der Submukosa: schmaler Pfeil. (A; B) Maßstabsbalken 100 μm , (C) Maßstabsbalken 50 μm .

Mittels HE-Übersichtsfärbung wurden histologische Veränderungen unter DSS-Behandlung von WT und *Has-3* KO Tieren untersucht.

Nach der DSS-Behandlung zeigten die WT Tiere eine signifikant erhöhte Punktesumme im Kolitis-Punktescore (Tabelle 11) gleichbedeutend mit einer verstärkten Kolitis. Dabei kam es zu einer verstärkten Einwanderung von mononukleären Zellen sowie zu einer Veränderung der Kryptenstruktur. Bereits basal traten sowohl bei WT als auch *Has-3* KO milde histologische Veränderungen mit einer Punktesumme von 4 auf. Nach der DSS Behandlung zeigten die WT Tiere einen signifikanten Anstieg der Punktesumme auf 10 entsprechend einer starken histologischen Veränderung. Dieser Effekt war bei den DSS-behandelten *Has-3* KO Tieren nicht mehr detektierbar (Abb. 10 A, B).

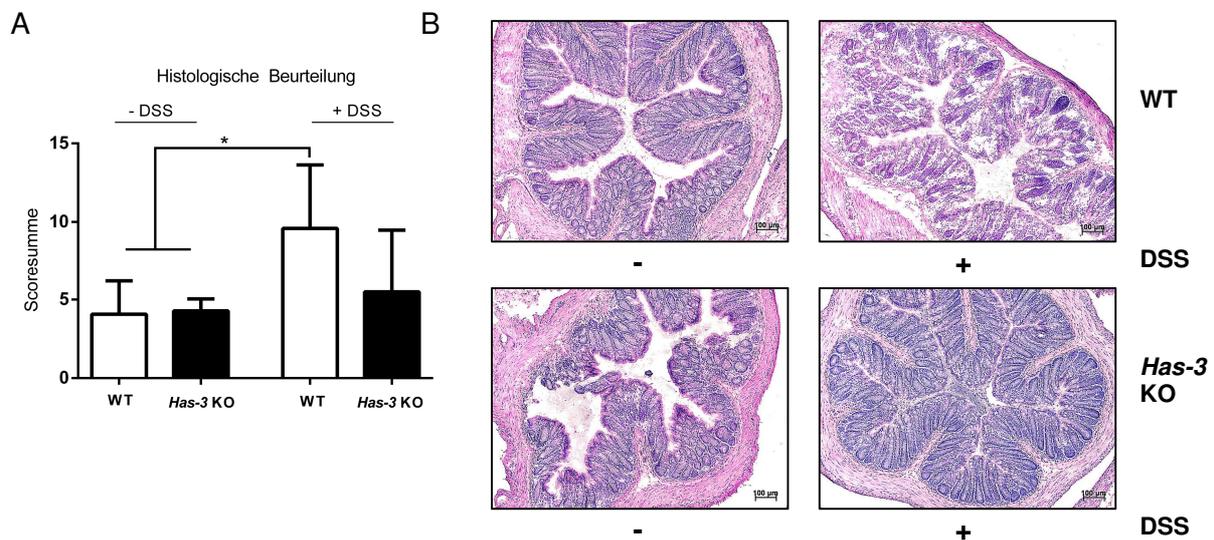


Abbildung 10: Histologische Beurteilung des Schweregrades der Kolitis

(A) Auswertung histologischer Veränderungen anhand des histologischem Kolitis-Punktescores von WT und *Has-3* KO Tieren ohne und mit DSS mittels ImageJ. (B) Exemplarische Darstellung der HE-Übersichtsfärbung distaler Kolonabschnitte von WT und *Has-3* KO Tieren ohne und mit DSS-Behandlung; Maßstabsbalken 100 µm. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; *P < 0,05; n=5-7.

4.3 Inflammation

Die Einwanderung von Leukozyten und Makrophagen innerhalb der *Lamina propria* wurde mittels immunhistochemischer Färbungen (CD45, F4/80) beurteilt.

4.3.1 Histologische Analyse von Leukozyten

WT und *Has-3* KO Tiere zeigten ohne DSS-Behandlung basal einen ähnlichen Anteil an Leukozyten. Unter DSS-Behandlung trat eine signifikante Akkumulation von Leukozyten bei WT Tieren innerhalb der *Lamina propria* auf. Bei DSS-behandelten *Has-3* KO Tieren wurden signifikant weniger Leukozyten gegenüber den DSS-behandelten WT Tieren detektiert (Abb. 11 A, B).

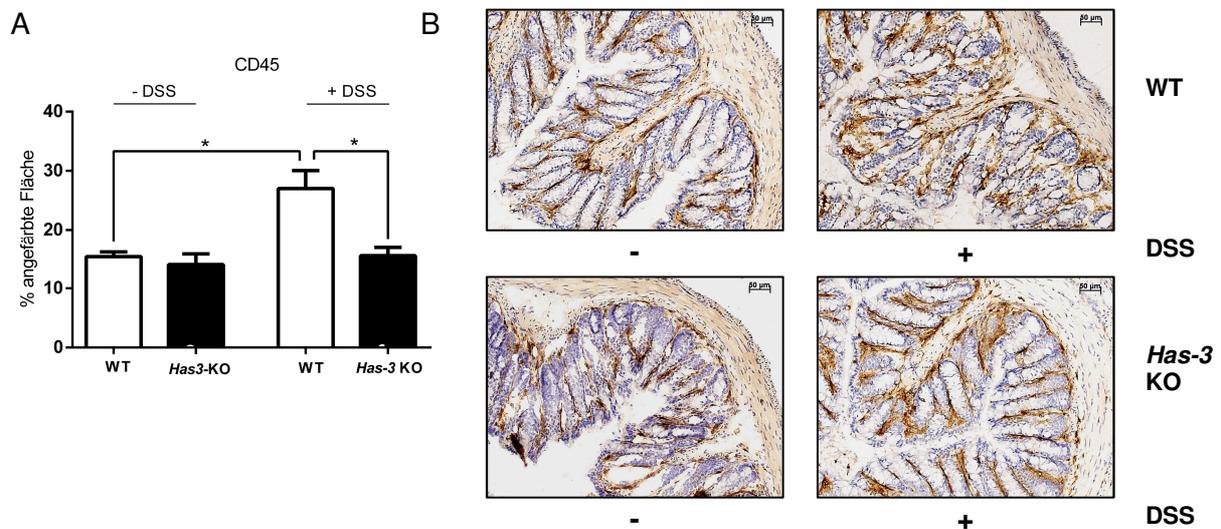


Abbildung 11: Detektion von Leukozyten mittels einer CD45-Färbung innerhalb der Mukosa

(A) Quantitative Auswertung der CD45-Färbung innerhalb der *Lamina propria* von WT und *Has-3* KO Tieren ohne und mit DSS mittels ImageJ. (B) Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von CD45-positiven Zellen in distalen Kolonabschnitten; Maßstabsbalken 50 μm. In braun dargestellt die CD45-positiven Zellen, die Hämalaun-gefärbten Zellkerne in blauer Darstellung. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; *P < 0,05; n=5-8.

4.3.2 Histologische Analyse von F4/80-positiven Makrophagen

Nach der DSS-Behandlung war es bei WT Tieren zu einer signifikanten Steigerung der Makrophagenakkumulation gekommen. Die *Has-3* KO Tiere konnten diesen Effekt inhibieren und zeigten signifikant weniger Makrophagen als die WT Kolutistiere (Abb. 12 A, B).

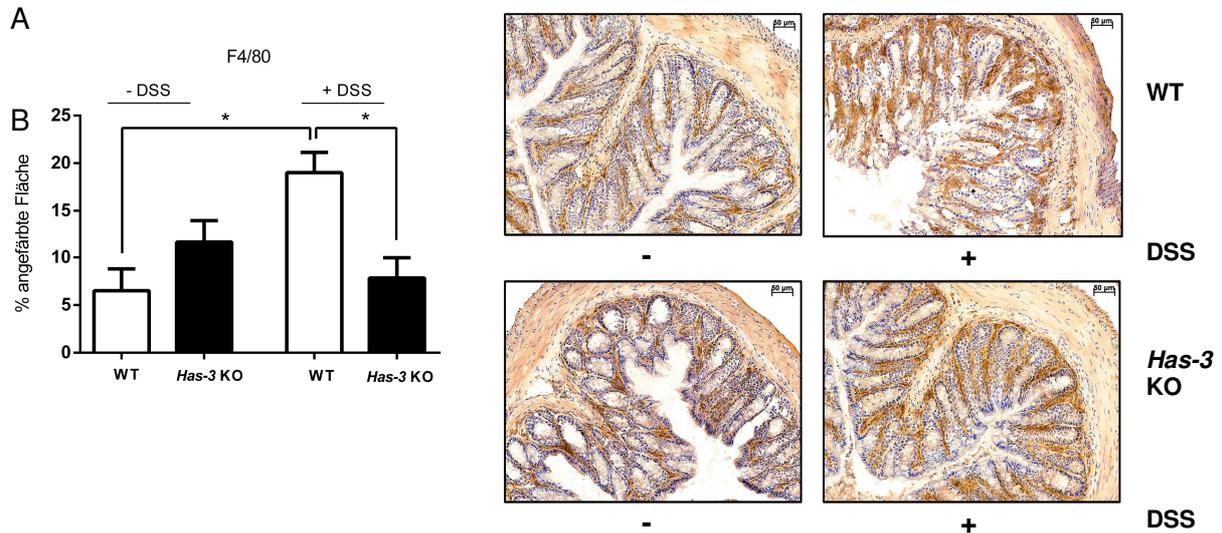


Abbildung 12: Detektion F4/80-positiver Makrophagen innerhalb der Mukosa

(A) Quantitative Auswertung der F4/80-Färbung innerhalb der *Lamina propria* von WT und *Has-3* KO Tiere ohne und mit DSS mittels ImageJ. (B) Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von F4/80-positiven Makrophagen; Maßstabsbalken 50 µm. In braun dargestellt die F4/80-positiven Zellen, die Hämalaun-gefärbten Zellkerne in blauer Darstellung. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; *P < 0,05; n=4-6.

4.4 Extrazellulärmatrix-Komponenten

Als weitere EZM-Komponenten wurden Biglykan und Decorin in immunhistochemischen Färbungen sowie die jeweilige mRNA Expression analysiert.

4.4.1 Biglykan

Basal trat bei *Has-3* KO Tieren ein Trend zu einer gesteigerten Biglykan-Expression innerhalb der Submukosa im Vergleich zum WT Tieren auf. Während bei WT Tieren mit DSS-Kolitis ein leichter Trend zu mehr Biglykan auffiel, war bei *Has-3* KO Tieren unter DSS eine Tendenz zu einer geringeren Biglykan-Akkumulation zu beobachten (Abb. 13 A, B).

Analog zur Immunhistochemie war die mRNA Expression von *Biglykan* in *Has-3* KO Tieren basal ein Trend zu einer gesteigerten Expression von *Biglykan* gegenüber den WT Tieren festgestellt worden. Unter DSS konnte in beiden Gruppen ein deutlicher Trend zu einer geringeren *Biglykan* mRNA Expression detektiert werden (Abb. 13 C).

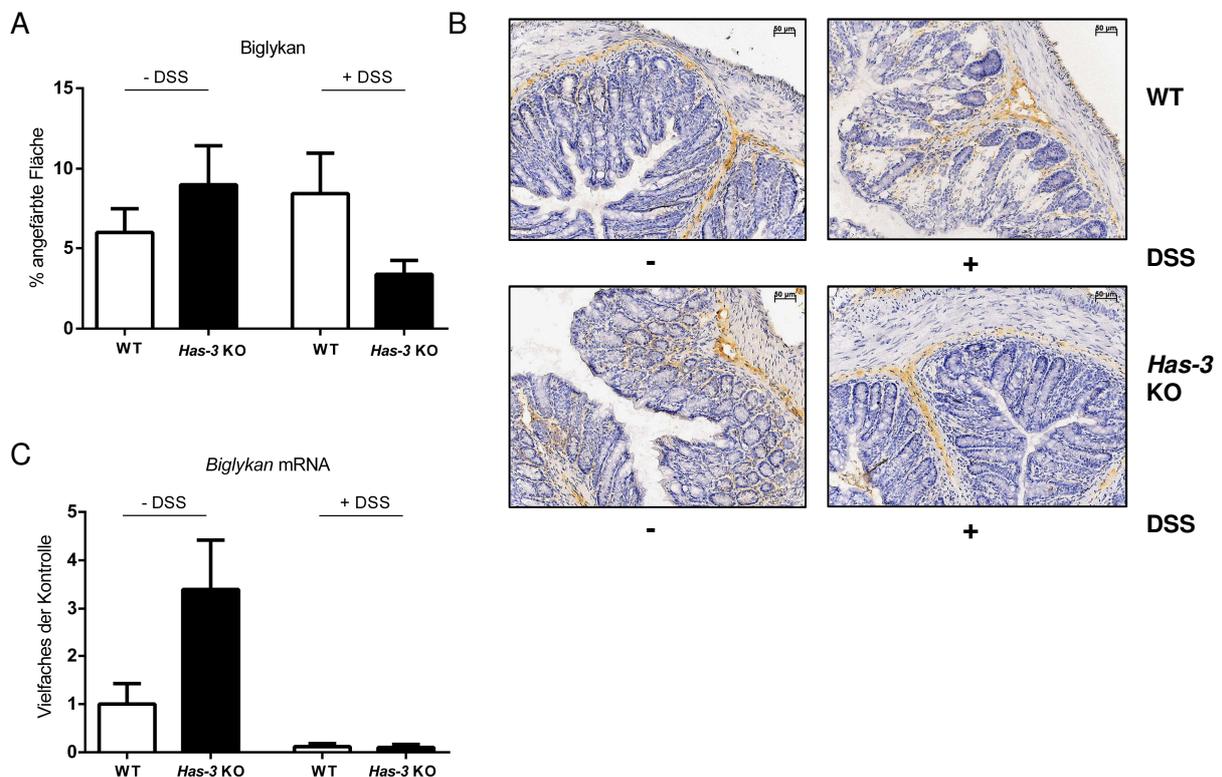


Abbildung 13: Histologische Verteilung und Genexpressionsanalyse von Biglykan innerhalb distaler Kolonabschnitte

(A) Quantitative Auswertung der Biglykan-Färbung innerhalb der Submukosa von WT und *Has-3* KO Tieren ohne und mit DSS mittels ImageJ. (B) Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Analyse des Auftretens von Biglykan innerhalb der Submukosa; Maßstabsbalken 50 μm. In braun dargestellt Biglykan, die Hämalaun-gefärbten Zellkerne in blauer Darstellung. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; *P < 0,05; n=3,5,3,4. (C) Genexpressionsanalyse von *Biglykan* in distalen Kolonproben mittels qRT-PCR. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; *P < 0,05; n=6,9,4,5.

4.4.2 Decorin

Immunhistochemisch stellten sich im Decorin-Gehalt innerhalb der Submukosa keine Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen unabhängig von der DSS-Kolitis dar (Abb. 14 A, B).

Auch in der qRT-PCR war die mRNA Expression von *Decorin* bei *Has-3* KO und WT Tieren vergleichbar. Bei DSS-induzierter Kolitis zeigte sich bei beiden Behandlungsgruppen eine Tendenz zu reduzierten *Decorin* mRNA-Expressionsleveln (Abb. 14 C).

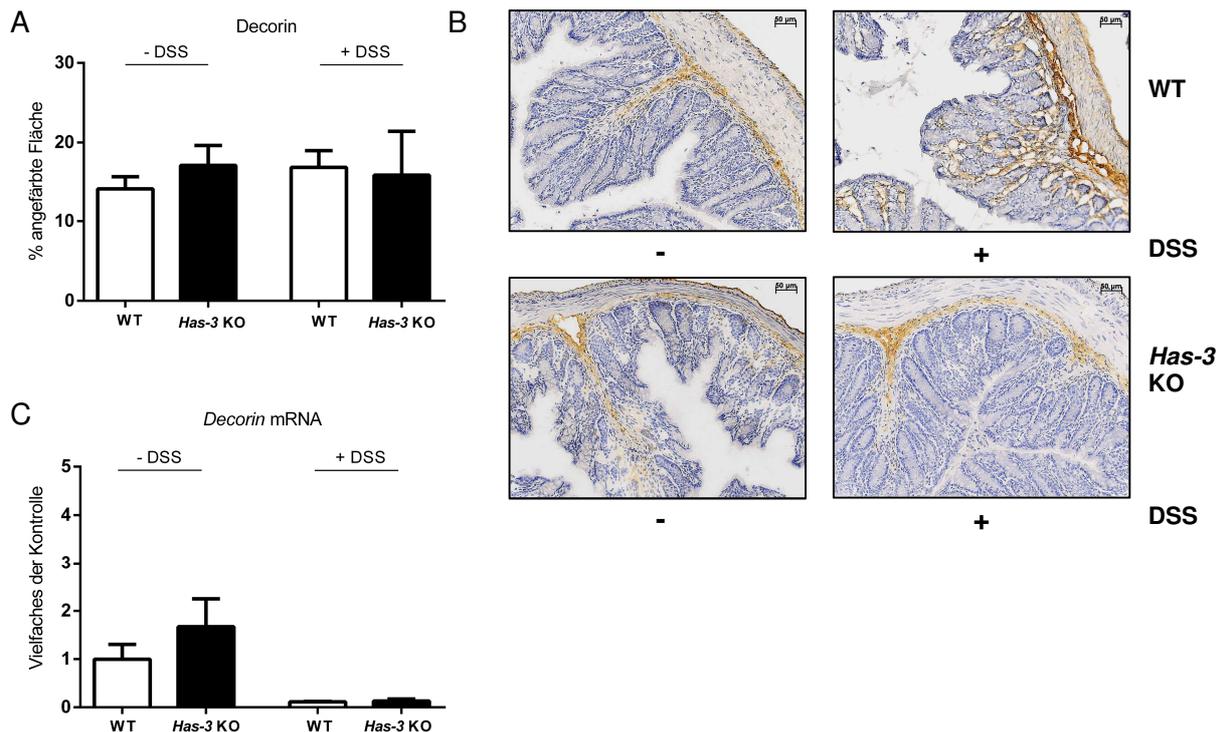


Abbildung 14: Histologische Verteilung und Genexpressionsanalyse von Decorin innerhalb distaler Kolonabschnitte

(A) Quantitative Auswertung der Decorin-Färbung innerhalb der Submukosa von WT und *Has-3* KO Tieren ohne und mit DSS mittels ImageJ. (B) Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Analyse des Auftretens von Decorin innerhalb der Submukosa; Maßstabsbalken 50 μm. In braun dargestellt Decorin, die Hämalaun-gefärbten Zellkerne in blauer Darstellung. Daten als Mittelwert ± SEM; *P < 0,05; n=3,4,4,4. (C) Genexpressionsanalyse von *Decorin* in distalen Kolonproben mittels qRT-PCR. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; *P < 0,05; n=6,9,6,4.

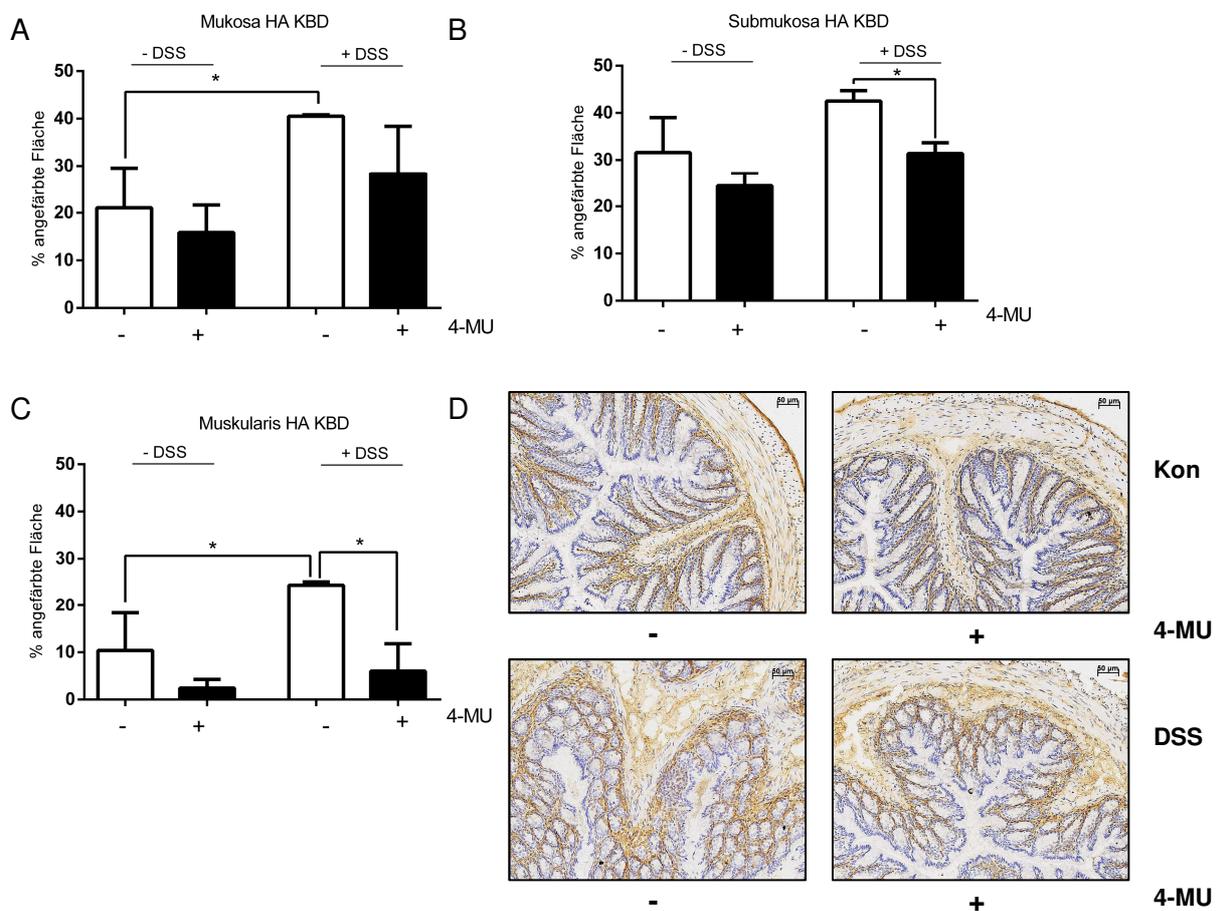
4.5 Hyaluronsäure-Expression im Rahmen einer pharmakologischen, Nicht-Isoenzym-spezifischen Hyaluronsäure-Synthese-Inhibition mittels 4-Methylumbelliferon

Des Weiteren sollten die Effekte einer Nicht-Isoenzym-spezifischen pharmakologischen Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU untersucht werden. Zunächst sollte nachgewiesen werden, dass es durch 4-MU zu einer suffizienten Reduktion der HA-Expression im Gewebe kommt und innerhalb welcher Darmschicht diese ggf. besonders ausgeprägt ist.

Immunhistochemisch konnte HA in allen Darmschichten detektiert werden (Abb. 15). Durch die 4-MU Behandlung bestätigte sich in allen Darmschichten der Trend zu weniger HA im Vergleich zur Kontrollgruppe (Placebo). Signifikant weniger HA zeigten 4-MU Tiere unter der DSS-Behandlung im Vergleich zu Kontrolltieren (Placebo DSS) nach der kurzen Behandlungsdauer in der Submukosa (Abb. 15 B) und in der Muskularis (Abb. 15 C). Im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis zeigten sowohl Placebo als auch 4-MU Tiere den Trend zu mehr HA in allen Darmschichten. Eine signifikante Steigerung der HA Expression war bei Placebo Tieren nach der kurzen DSS-Behandlungsdauer (KBD) in Mukosa mit (Abb. 15 A) und Muskularis (Abb. 15 C) aufgetreten. Die 4-MU Gruppen zeigten unter DSS lediglich einen Trend zu mehr HA.

Nach der langen Behandlungsdauer (LBD) stellten sich vergleichbare Trends, jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr dar (Abb. 15 E-G). Ebenso fällt der reduzierende Effekt der 4-MU Behandlung sowohl basal als auch unter DSS-Behandlung geringer aus. Dies könnte mit der Zerstörung der histologischen Architektur zusammenhängen, wie Ergebnisse des Kolitis-Punktescores gezeigt haben (siehe 4.6.3).

Zusammenfassend zeigt sich der stärkste Effekt der 4-MU Wirkung im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis innerhalb der Muskularis mit einer Reduktion von um 75% des HA-Gehaltes (Abb. 15 C).



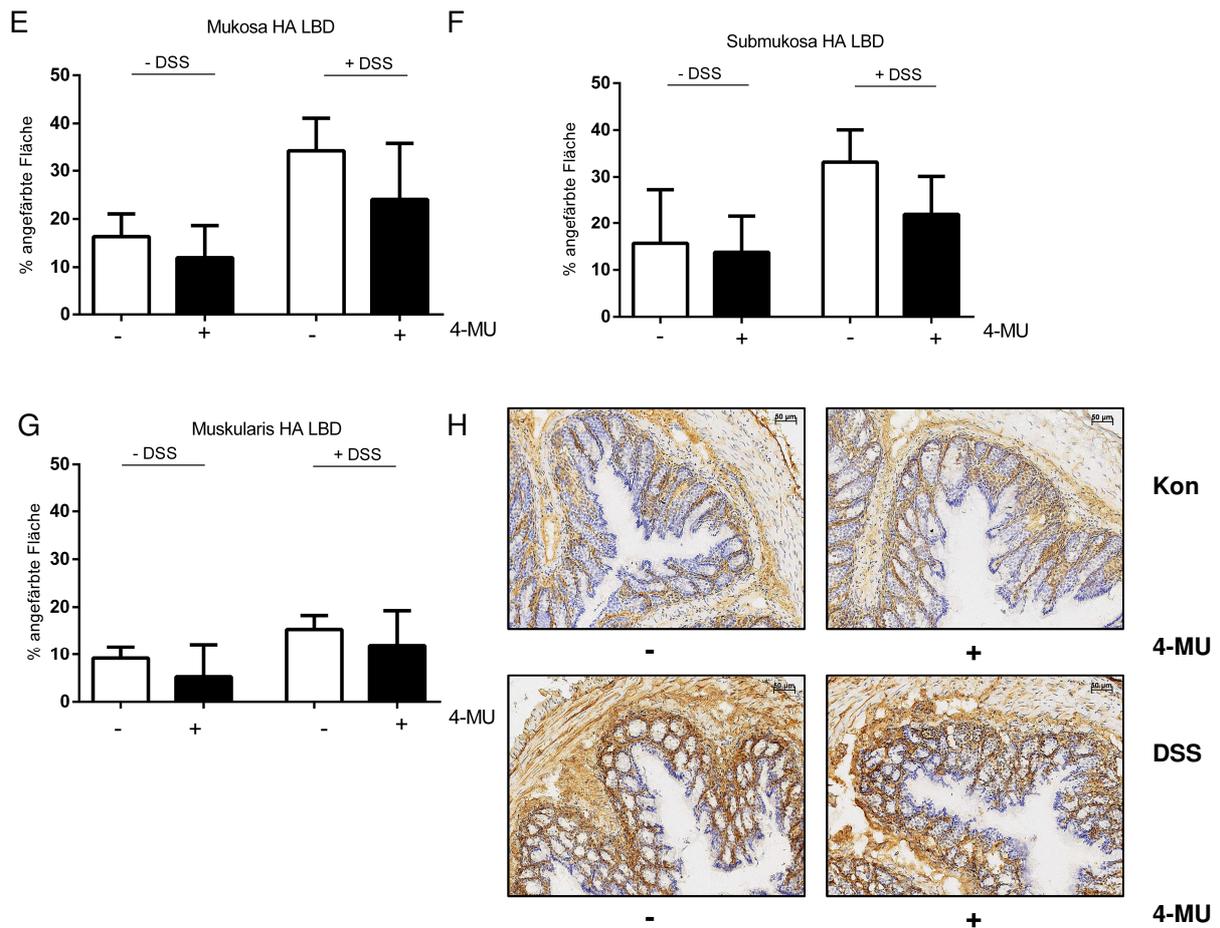


Abbildung 15: Verteilung von HA innerhalb der einzelnen Darmschichten der Kolonwand

(A-C, E-G) Quantitative Auswertung der HA-Färbung in der (A, E) Mukosa, (B, F) Submukosa und (C, G) Muskularis für (A-C) die kurze Behandlungsdauer (KBD) und (E-G) die lange Behandlungsdauer (LBD) von Placebo und 4-MU behandelten Tieren ohne und mit DSS mittels ImageJ. (D, H) Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von HA in distalen Kolonabschnitten (D) der KBD und (H) LBD; Maßstabsbalken 50 μm . In braun dargestellt HA, die Hämalan-angefärbten Zellkerne in blauer Darstellung. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM; *P < 0,05; Mukosa KBD n=3-4; LBD n=4-6. Submukosa KBD n=3-4; LBD n=4-5. Muskularis KBD n=3-4; LBD n=4-6.

4.6 Einfluss einer Nicht-Isoenzym-spezifischen Inhibition der Hyaluronsäuresynthese auf den Schweregrad und die Ausprägung der akuten Kolitis

Im Folgenden wurden der Gewichtsverlauf, makroskopische und histologische Effekte mit und ohne DSS-induzierter Kolitis nach einer kurzen und nach einer langen Behandlungsdauer beurteilt und verglichen. Darüber hinaus wurden inflammatorische Zellen und Zytokine, sowie die Expression weiterer EZM-Komponenten und die Expression HA-spezifischer Rezeptoren untersucht.

4.6.1 Gewichtsverlauf

Im Zuge der DSS-Behandlung kam es zu einem signifikanten Gewichtsabfall der 4-MU-behandelten Tiere im Vergleich zu den Placebo Tieren (Abb. 16). Während bei den Placebo Tieren unter DSS von Tag 6 auf Tag 7 ein Gewichtsabfall von 4% im Vergleich zu Tag 1 auftrat, betrug dieser bei der 4-MU Tieren 19%.

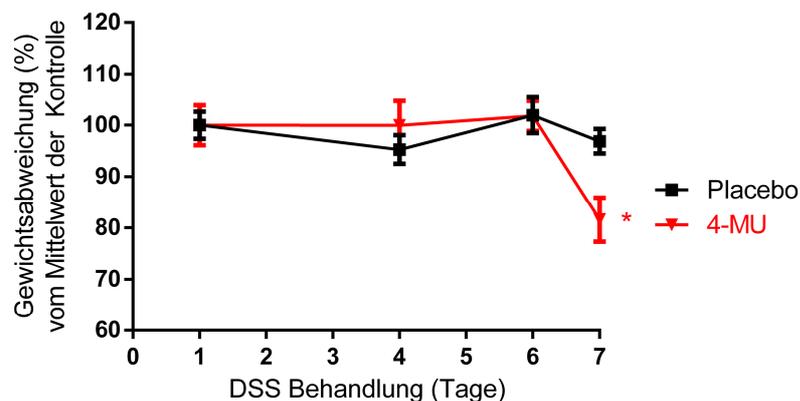


Abbildung 16: Gewichtsverlauf 4-MU behandelte Tiere im Vergleich zu Placebo Tieren nach DSS-Behandlung

Gewichtsverlauf der DSS behandelten Tiere nach 14-tägiger Vorbehandlung mit 4-MU bzw. Placebo-Futter, dargestellt als prozentuale Abweichung vom Ausgangsgewicht der jeweiligen Kontrolle ohne DSS-Behandlung an Behandlungstag 1 (=100%). Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM; *P < 0,05; n=10.

4.6.2 Makroskopische Veränderung der Kolongewicht und -länge

Im Zuge der DSS-induzierten Kolitis zeigte sich nach der kurzen Behandlungsdauer der Trend einer Verkürzung des Kolons (Abb. 17 A) in beiden Behandlungsgruppen. Nach der langen Behandlungsdauer fiel eine signifikante Abnahme der relativen Darmlänge sowohl in der Placebo als auch 4-MU Gruppe auf (Abb. 17 B). Es stellten sich keine Unterschiede zwischen Placebo und 4-MU behandelten Tieren dar.

Nach der kurzen Behandlungsdauer war bei 4-MU-behandelten Tieren unter DSS im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle das relative Darmgewicht signifikant erhöht, für die Placebo Tiere zeigte sich nur ein Trend zu mehr (Abb. 17 C). Nach der langen Behandlungsdauer konnte demgegenüber eine signifikante Zunahme des relativen Kolongewichtes bei den Placebo behandelten Tieren unter DSS-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Bei den 4-MU Tieren war dieser DSS-induzierte Effekt nicht detektierbar und es zeigte sich keine Kolongewichtszunahme mehr. Das Darmgewicht der 4-MU DSS Tiere war signifikant leichter als das der DSS Placebo Tiere (Abb. 17 D), was auch in diesem Fall mit der starken histopathologischen Zerstörung der Darmgewebe erklärt werden könnte.

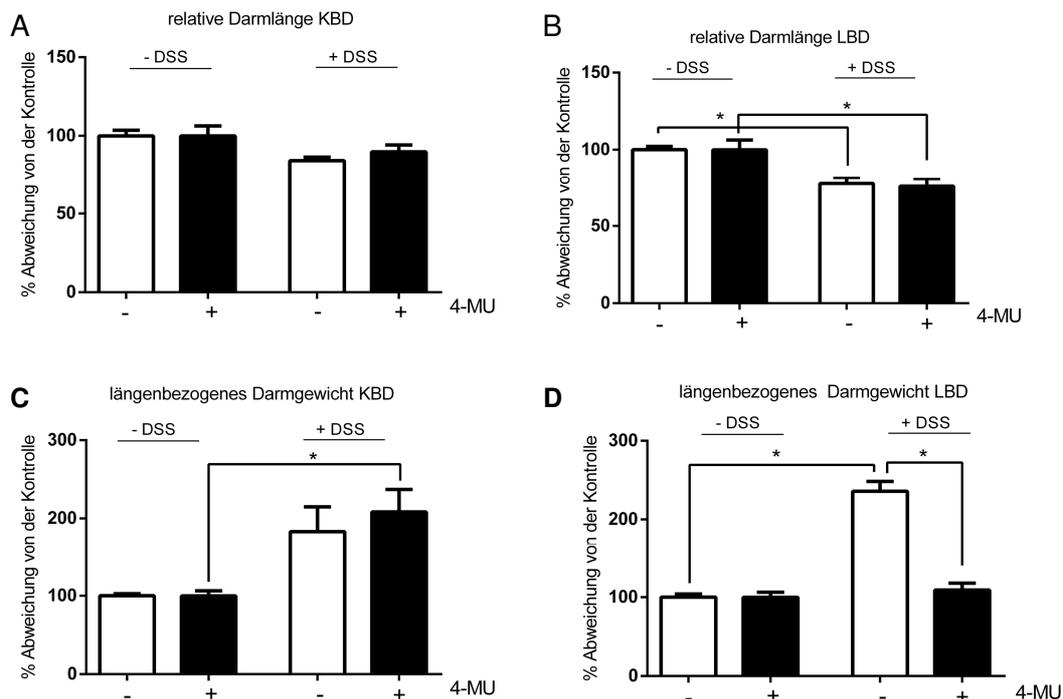


Abbildung 17: Veränderungen der Kolonlänge und des Kolongewichtes unter DSS-Behandlung

(A, B) Auswertung der Darmlänge (A) der kurzen Behandlungsdauer (KBD) und (B) der langen Behandlungsdauer (LBD) sowie (C, D) des Darmgewichtes im Verhältnis zur Darmlänge (C) der KBD und (D) LBD von Placebo und 4-MU behandelten Tieren. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung zur jeweiligen Kontrolle (-DSS), welche als jeweilige Referenzgruppe gleich 100% gesetzt wurde. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM; *P < 0,05; KBD n= 4, 4, 6, 8; LBD n=6, 5, 6, 5.

4.6.3 Histologische Beurteilung der Darmstruktur

Basal zeigten Placebo und 4-MU behandelte Tiere eine vergleichbare histologische Struktur und Kolitis-Punktescore. Unter der DSS-induzierten Kolitis zeigte sich histologisch ein signifikant erhöhter Kolitis-Punktescore sowohl der Placebo Tiere als auch der 4-MU Tiere im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe ohne Kolitis (-DSS) zu beiden Behandlungsdauern. Nach der kurzen Behandlungsdauer war der Kolitis-Punktescor der 4-MU behandelten Kolitis-Tiere mit einer mittleren Punktesumme von 12 im Vergleich zur Placebo Kolitis Gruppe signifikant erhöht (Abb. 18 A, B). Dieser Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war in Folge der massiven Destruktion des Kolons nach der langen DSS-Behandlungsdauer nicht mehr zu beobachten. (Abb. 18 C, D).

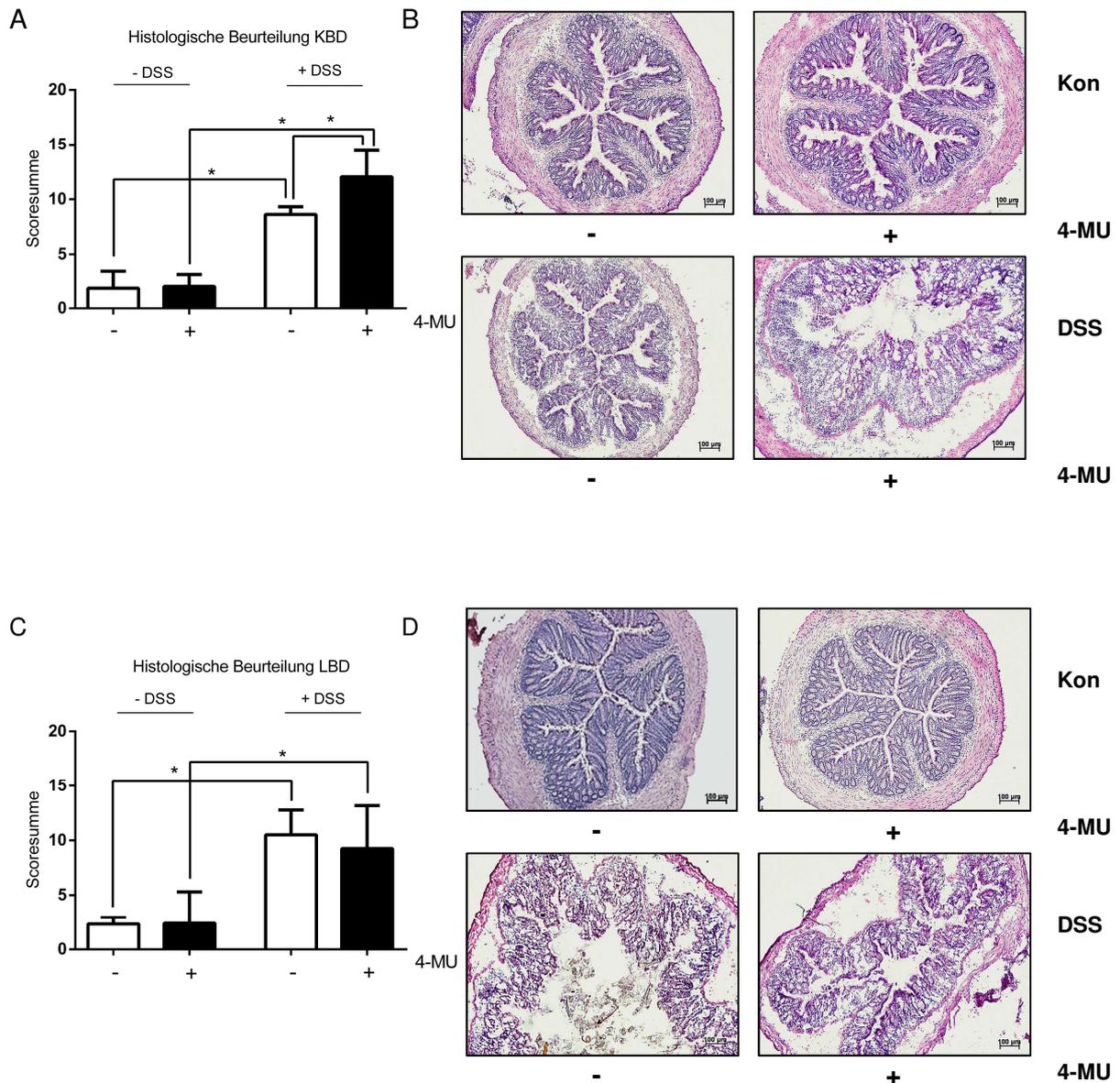


Abbildung 18: Histologische Beurteilung des Schweregrades der Kolitis

(A, C) Auswertung histologischer Veränderungen anhand des histologischen Kolitis-Punktescores nach (A) der kurzen Behandlungsdauer (KBD) und (C) der langen Behandlungsdauer (LBD) von Placebo und 4-MU behandelten Tieren mittels ImageJ. (B, D) Exemplarische Darstellung der HE-Übersichtsfärbung distaler Kolonabschnitte für die (B) KBD und die (D) LBD; Maßstabsbalken 100 µm. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; *P < 0,05; KBD n=4; LBD n=6.

4.7 Inflammation

Zur Beurteilung von Veränderungen des Inflammationsgeschehens der akuten Kolitis nach pharmakologischer, Nicht-Isoenzym-spezifischer HA-Syntheseinhibition mittels 4-MU wurden Leukozyten und Makrophagen immunhistochemisch gefärbt und die mRNA Expression der proinflammatorischen Zytokine *Tnf- α* , *Il-1 β* und *Mcp-1* mittels qRT-PCR analysiert.

4.7.1 Histologische Analyse von Leukozyten

Basal zeigten Placebo und 4-MU Tiere gleich viele Leukozyten. Bei DSS-induzierter Kolitis kam es zu einer signifikanten Erhöhung von Leukozyten innerhalb der *Lamina propria* bei Placebo und 4-MU behandelten Tieren zu beiden Behandlungsdauern. Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren nicht detektierbar (Abb. 19 A-D).

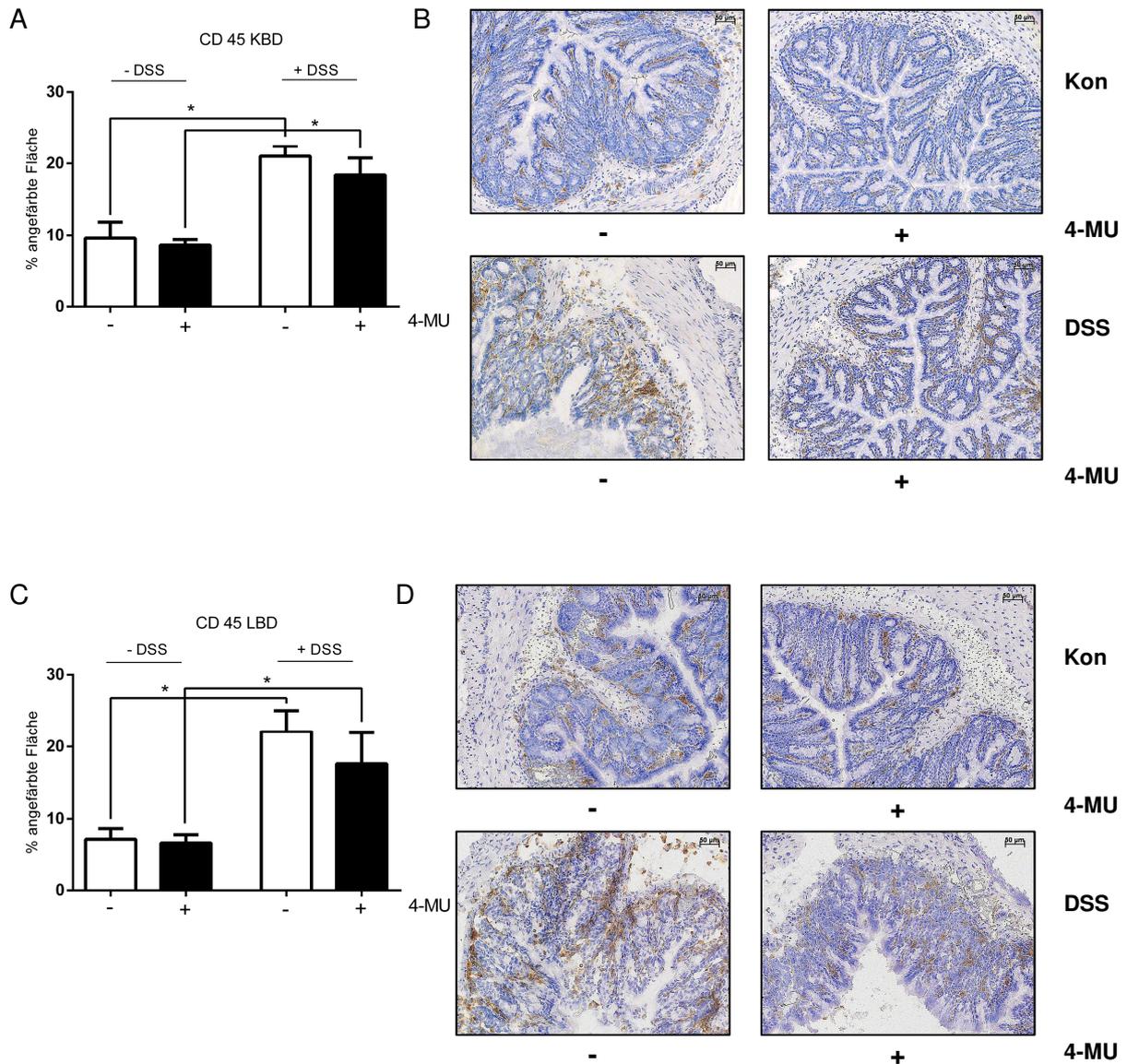


Abbildung 19: Detektion von Leukozyten mittels CD45-Färbung innerhalb der Mukosa

(A, C) Quantitative Auswertung der CD45-Färbung innerhalb der *Lamina propria* für (A) die kurze Behandlungsdauer (KBD) und (C) die lange Behandlungsdauer (LBD) von Placebo und 4-MU behandelten Tieren ohne und mit DSS mittels ImageJ. (B, D) Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von CD45-positiven Zellen in distalen Kolonabschnitten der KBD (B) und LBD (D); Maßstabsbalken 50 μ m. In braun dargestellt die CD45-positiven Zellen, die Hämalaungefärbten Zellkerne in blauer Darstellung. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM; *P < 0,05; KBD: n=4-9; LBD: n=6.

4.7.2 Histologische Analyse von F4/80-positiven Makrophagen

Nach der kurzen DSS-Behandlungsdauer von 5 Tagen zeigte sich eine signifikante Steigerung der Makrophagenakkumulation innerhalb der *Lamina propria* sowohl bei Placebo als auch 4-MU Tieren. Unterschiede zwischen beiden Kolitis-Gruppen zeigten sich nicht (Abb. 20 A, B). Nach der langen Behandlungsdauer hingegen trat eine signifikante Makrophagenakkumulation lediglich bei der 4-MU Kolitisgruppe auf (Abb. 20 C, D).

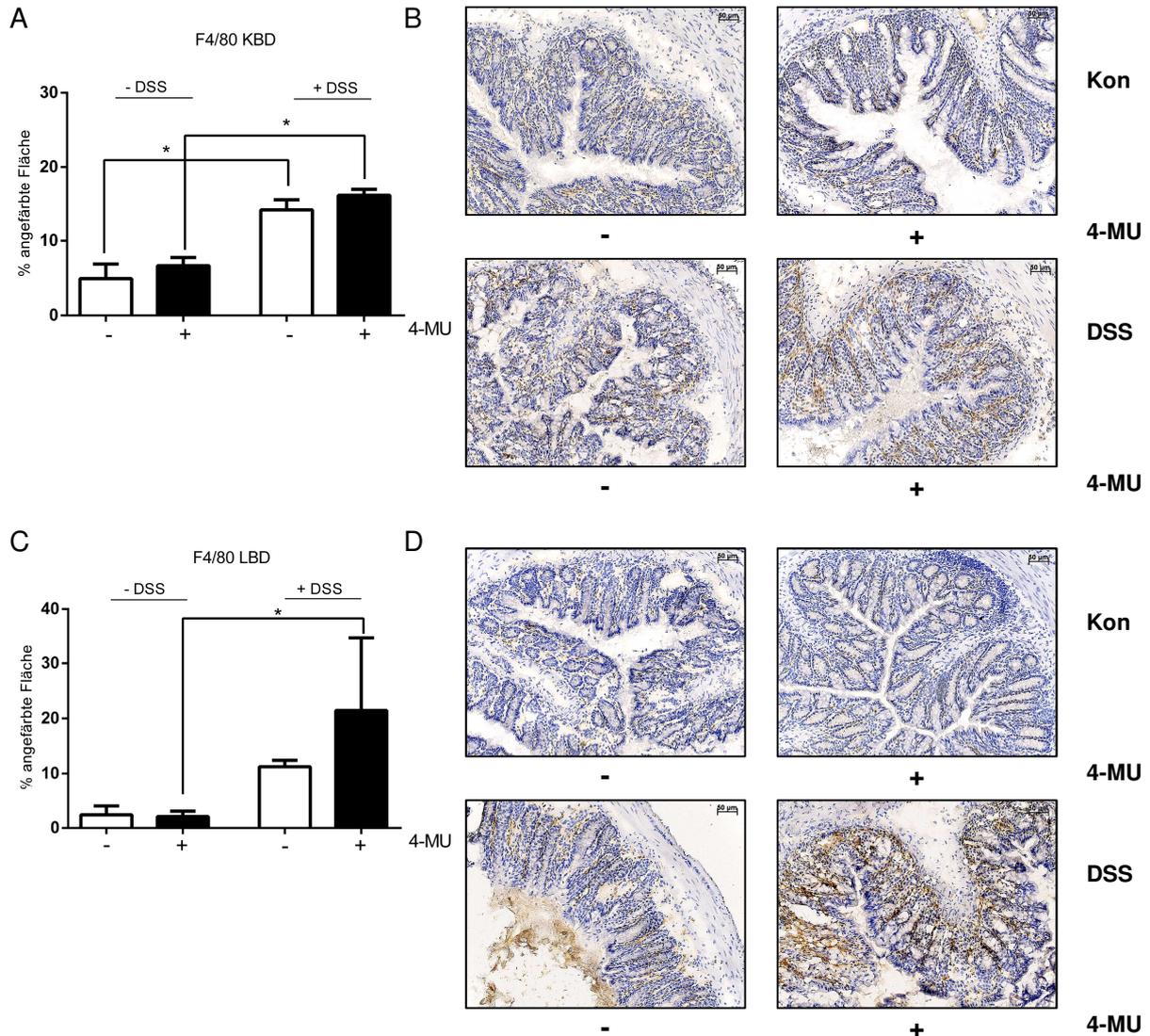


Abbildung 20: Detektion F4/80-positiver Makrophagen innerhalb der Mukosa

(A, C) Quantitative Auswertung der F4/80- Färbung innerhalb der Lamina propria der Mukosa für (A) die kurze Behandlungsdauer (KBD) und (C) die lange Behandlungsdauer (LBD) von Placebo und 4-MU behandelten Tieren ohne und mit DSS mittels ImageJ. (B, D) Exemplarische Darstellung der immunohistochemischen Färbung von F4/80-positiven Zellen in distalen Kolonabschnitten der (B) KBD und (D) LBD; Maßstabsbalken 50 μ m. In braun dargestellt die F4/80-positiven Zellen, die Hämalaun-gefärbten Zellkerne in blauer Darstellung. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM; *P < 0,05; KBD n=3-4. LBD n=3-4.

4.7.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion-Untersuchungen proinflammatorischer Zytokine

Mittels qRT-PCR wurden die proinflammatorischen Zytokine *Tnf- α* , *Il-1 β* und *Mcp-1* untersucht. Basal gab es keine Expressionsunterschiede der Zytokine zwischen Placebo und der 4-MU Tieren. Nach der langen DSS-Behandlungsdauer trat sowohl bei Placebo als auch 4-MU behandelten Tieren eine signifikante Steigerung der *Tnf- α* mRNA Expression im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle auf. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der *Tnf- α* Expression zwischen Placebo und 4-MU behandelten DSS Tieren detektiert (Abb. 21 A). Die Expression von *Il-1 β* fiel bei den 4-MU Kolitistieren signifikant gesteigert aus, die Placebo behandelten Kolitistiere zeigten lediglich den Trend zu mehr *Il-1 β* (Abb. 21 B). In beiden Behandlungsgruppen fiel eine Tendenz zu einer gesteigerten *Mcp-1* Expression bei der DSS-induzierter Kolitis auf, Unterschiede zwischen Placebo und 4-MU Tieren konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. (Abb. 21 C).

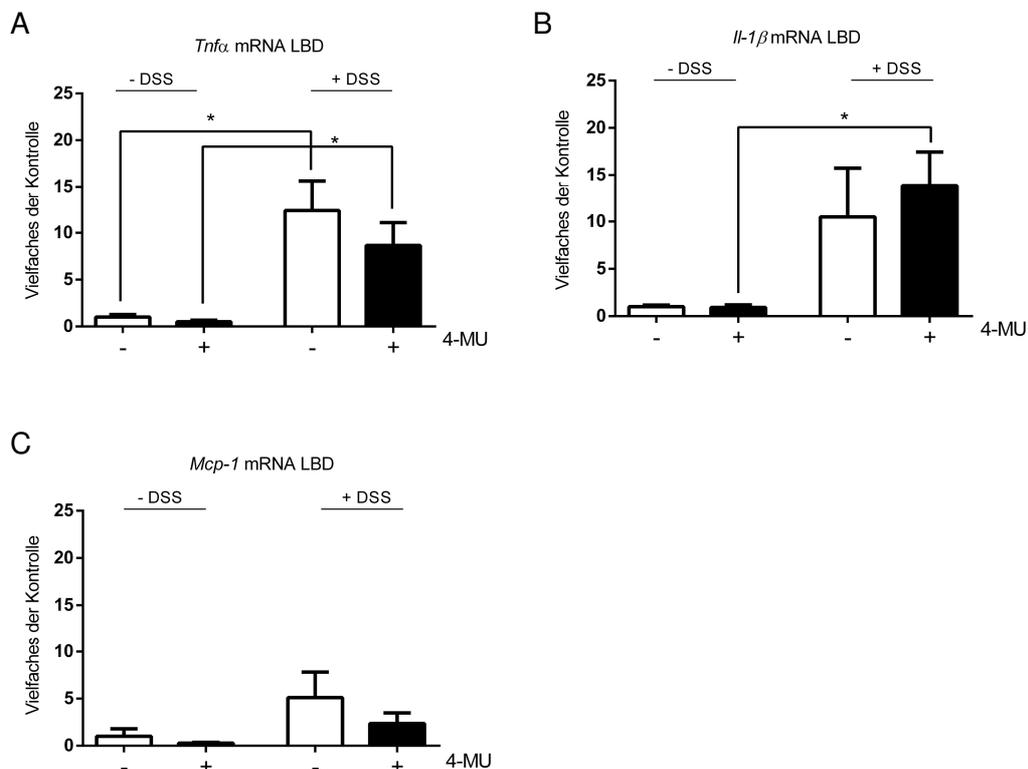


Abbildung 21: Darstellung der mRNA Expression proinflammatorischer Zytokine

(A-C) Untersucht wurde die mRNA Expression von (A) *Tnf- α* , (B) *Il-1 β* und (C) *Mcp-1* jeweils für die lange Behandlungsdauer (LBD) von Placebo und 4-MU behandelten Tieren ohne und mit DSS. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM; *, $P < 0,05$; *Tnf- α* n= 4,5,4,4. *Il-1 β* n=4,5,3,3. *Mcp-1* n= 4,5,4,3.

4.8 Extrazellulärmatrix

Neben der HA-Akkumulation wurden die Proteoglykane Biglykan und Decorin, als weitere EZM-Komponenten, innerhalb der Submukosa mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen und qRT-PCR untersucht.

4.8.1.1 Biglykan

Histologisch zeigte sich ein Trend zu mehr Biglykan-Expression nach DSS Behandlung bei den Placebo und 4-MU Tieren nach der kurzen Behandlungsdauer. Dabei gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 22 A, B). Nach der langen Behandlungsdauer war kein entsprechender Trend mehr detektierbar (Abb. 22 C, D). Ebenso erbrachte die qRT-PCR keine Unterschiede der einzelnen Behandlungsgruppen nach der langen Behandlungsdauer (Abb. 22 E).

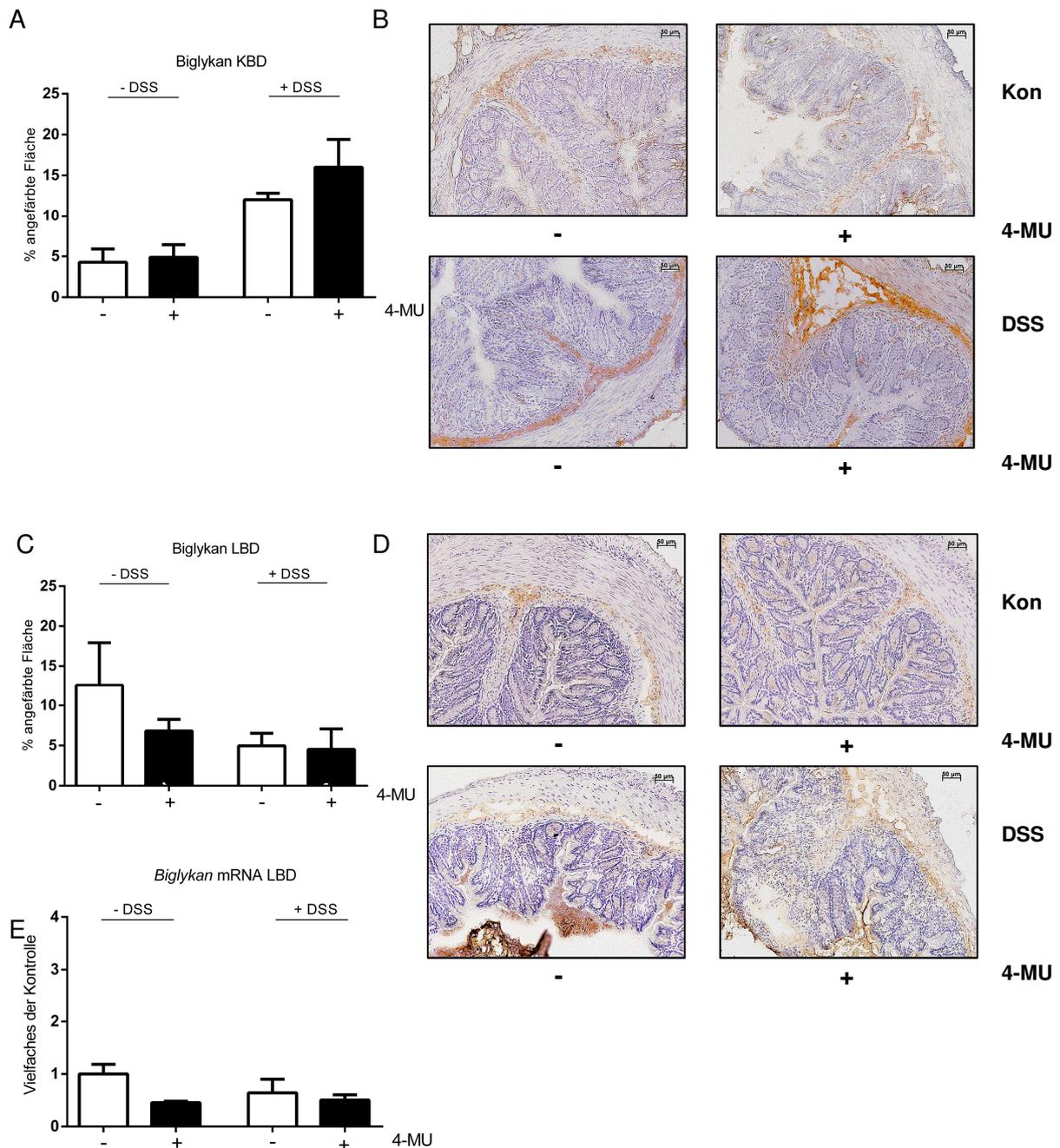


Abbildung 22: Histologische Verteilung und Genexpressionsanalyse von Biglykan innerhalb distaler Kolonabschnitte

(A, C) Quantitative Auswertung der Biglykan-Färbung innerhalb der Submukosa für (A) die kurze Behandlungsdauer (KBD) und (C) die lange Behandlungsdauer (LBD) von Placebo und 4-MU behandelten Tieren ohne und mit DSS mittels ImageJ. (B, D) Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von Biglykan innerhalb der Submukosa in der (B) KBD und (D) LBD; Maßstabsbalken 50 μ m. In braun dargestellt Biglykan, die Hämalaun-gefärbten Zellkerne in blauer Darstellung. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM; * $P < 0,05$; KBD $n=4-6$. LBD $n=3-7$. (E) Genexpressorische Auswertung *Biglykan*-mRNA mittels qRT-PCR distaler Kolonproben in der LBD. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM; * $P < 0,05$; $n=4,5,4,4$.

4.8.1.2 Decorin

Immunhistochemisch fiel nach der kurzen DSS-Behandlungsdauer bei den Placebo Tieren der Trend zu weniger, bei den 4-MU Tieren unter DSS demgegenüber ein Trend zu mehr Decorin auf. Dabei zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 23 A, B).

Auch nach der langen Behandlungsdauer gab es immunhistochemisch keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 23 C, D).

Die Analyse der mRNA Expression zeigte lediglich einen Trend zu mehr Decorin bei den 4-MU behandelten Tieren gegenüber den Placebo Tieren ohne und mit DSS, jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abb. 23 E).

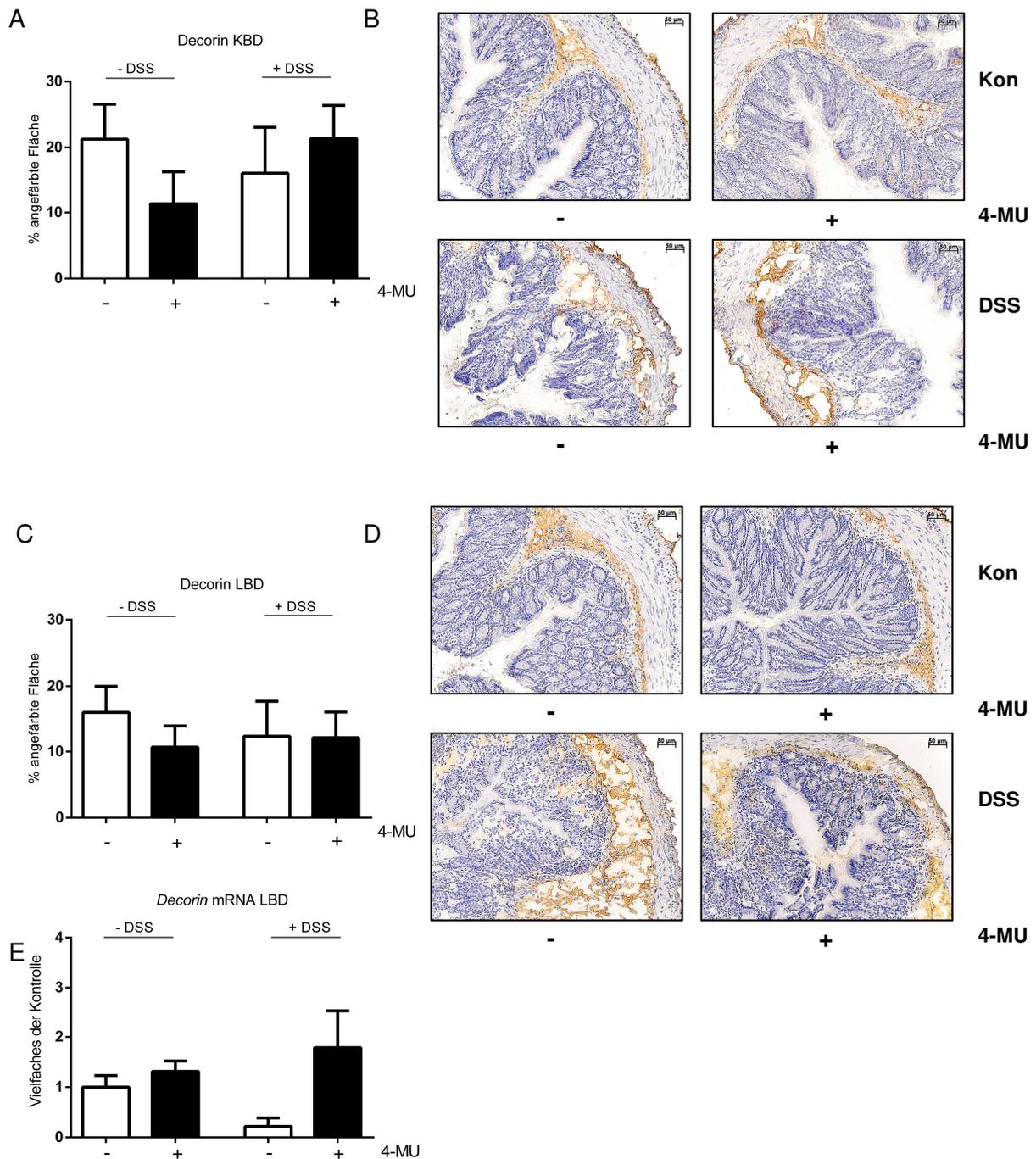


Abbildung 23: Histologische Verteilung und Genexpressionsanalyse von Decorin innerhalb distaler Kolonabschnitte

(A, C) Quantitative Auswertung der Decorin-Färbung innerhalb der Submukosa für (A) die kurze Behandlungsdauer (KBD) und (C) die lange Behandlungsdauer (LBD) von Placebo und 4-MU behandelten Tieren ohne und mit DSS mittels ImageJ. (B, D) Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Analyse des Auftretens von Decorin innerhalb der Submukosa in der (B) KBD und (D) LBD; Maßstabsbalken 50 μ m. In braun dargestellt Decorin, die Hämalaun-gefärbten Zellkerne in blauer Darstellung. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM; *P < 0,05; KBD n=4-9. LBD n=5-6. (E) Genexpressorische Auswertung *Decorin*-mRNA mittels qRT-PCR distaler Kolonproben nach der LBD. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM; *P < 0,05; LBD n=4,5,3,4.

4.9 Genexpression weiterer Komponenten des Hyaluronsäure-Systems

Mit Hilfe der qRT-PCR sollten Veränderungen des Expressionsprofils von *Cd44* und *Rhamm* analysiert werden.

4.9.1 Cd44

Die Analyse der *Cd44* Expression zeigte basal keine Unterschiede zwischen Placebo und 4-MU behandelten Tieren. Nach der langen DSS-Behandlungsdauer kam es zu einer signifikanten Reduktion von *Cd44* bei sowohl den Placebo als auch den 4-MU Tieren (Abb. 24). Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren jedoch nicht erkennbar.

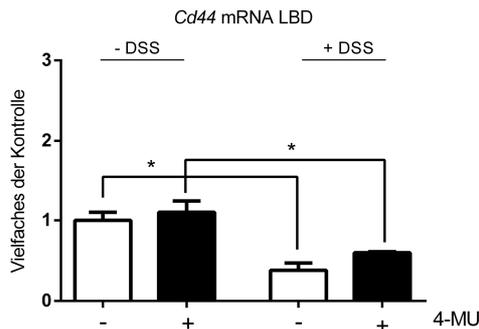


Abbildung 24: Bestimmung der mRNA Expression von Cd44

Genexpressionsanalyse der *Cd44* mRNA nach der langen Behandlungsdauer (LBD) von Placebo und 4-MU behandelten Tieren ohne und mit DSS. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM; *P < 0,05. LBD n=4,5,3,3.

4.9.2 Rhamm

Basal zeigten beide Behandlungsgruppen (Placebo/4-MU) die gleiche mRNA Expression von *Rhamm*. Nach der langen DSS-Behandlungsdauer fiel eine signifikante Reduktion der *Rhamm* Expression bei den 4-MU Tieren auf. Die Placebo behandelten Tiere wiesen bei DSS-Kolitis nur einen Trend zu weniger *Rhamm* Expression auf (Abb. 25).

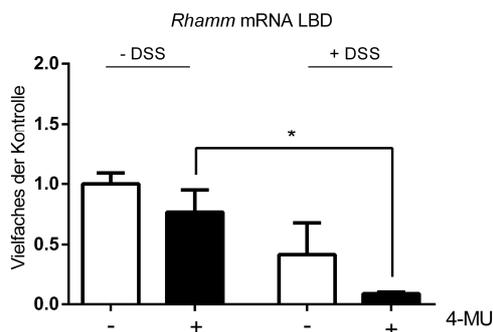


Abbildung 25: Bestimmung der mRNA Expression von Rhamm

Genexpressionssanalyse der *Rhamm* mRNA nach der LBD von Placebo und 4-MU behandelten Tieren ohne und mit DSS. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM; LBD n=4,5,3,4.*P <0,05.

5 Diskussion

Verschiedene Studien konnten belegen, dass es im Rahmen chronischer Inflammationsprozesse, wie z.B. der Atherosklerose, zu einer Akkumulation von HA im Gewebe kommt [75].

Auch bei CED Patienten ist bekannt, dass es in der entzündeten Darmschleimhaut zu einer verstärkten Akkumulation von HA kommt [76]. In unserer Studie konnten wir eine solche HA-Akkumulation am Mausmodell in Abhängigkeit der DSS-Behandlungsdauer nachweisen. Bereits Studien von Kessler *et al.* haben eine Abhängigkeit der Hyaluronsäureexpression sowohl innerhalb der einzelnen Darmschichten als auch der DSS-Behandlungsdauer postuliert [43, 61]. Hierbei wurden pro- und antiinflammatorischen Effekte der HA kontrovers diskutiert. Frühere Studien legten einen maßgeblichen Einfluss der *Has-3* im inflammatorischen Geschehen der akuten Kolitis nahe, obschon auch der Einfluss weiterer *Has*-Isoenzyme möglich schien [26, 43, 62, 68].

Hinsichtlich einer therapeutischen Option, welche eine Modulation der HA-reichen Matrix bewirkt, besteht Möglichkeit des Einsatzes des pharmakologischen Inhibitors der HA-Synthese 4-MU. Bislang liegen keine Studien vor, die den Einfluss einer solchen Nicht-Isoenzym-spezifischen pharmakologischen Inhibition im inflammatorischen Geschehen der akuten Kolitis untersuchen. Ebenso wurde eine Beteiligung weiterer Komponenten des HA-Systems wie Rezeptoren, Hyaluronidasen aber auch andere Matrix-Komponenten wie Decorin und Biglykan, bislang nicht untersucht.

Aufgrund dieser Überlegungen sollte in unserer Studie untersucht werden,

- I) inwieweit ein *Has-3* selektiver KO den Schweregrad und die Inflammation im Rahmen der der akuten Kolitis beeinflusst und es zu weiteren Auswirkungen auf Komponenten des HA-Systems kommt
und
- II) ob eine pharmakologische HA-Synthesehemmung eine mögliche Therapieoption liefert.

5.1 Hyaluronsäuresynthase-3 Defizienz

Die vorliegende Arbeit konnte positive Effekte einer *Has-3* Defizienz im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis nachweisen. Basal waren keine Veränderung der HA-Expression und Lokalisation zwischen WT und *Has-3* KO Tieren in allen drei Darmschichten immunhistohemisch nachweisbar. Dies ermöglicht eine ungestörte Funktionsausübung der physiologischen HA-Funktion im Gewebe und der Zell-Zell-Interaktion, sowie der Geweberegeneration [18, 36]. Die im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis verstärkte HA-Akkumulation war jedoch in den Tieren mit einer genetischen *Has-3* Deletion inhibiert (Abb. 6).

Frühere Studien von de la Motte *et al.* und Kessler *et al.* stellten eine Akkumulation von HA im Rahmen einer DSS-induzierten Kolitis dar und postulierten, dass dies mit einem klinisch und histologisch verschlechtertem Outcome einhergeht [43]. Demgegenüber wurde bei Zheng *et al.* ein protektiver Effekt nach exogen zugeführter HMW-HA bei DSS-induzierter Kolitis aufgezeigt [62]. Somit erschien es unklar, welche Rolle die HAS3-abhängige HA nun für den Krankheitsverlauf der akuten Kolitis besitzen würde. Insgesamt konnte in den *Has3*-defizienten Tieren eine deutlich mildere Kolitissymptomatik einhergehend mit einem besseren histologischen Outcome, einem reduzierten Gewichtsverlust, einer geringeren Kolonverkürzung und geringeren Invasion von Entzündungszellen festgestellt werden.

In früheren Studien konnten de la Motte *et al.* eine Expressionssteigerung der *Has-2* und *-3* mRNA in mikrovaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen [26], Kessler *et al.* eine Steigerung der *Has-3* mRNA in Makrophagen zeigen [61]. Während der Erstellung dieser Arbeit wiesen Kessler *et al.* nach, dass es bei einer genetischen Deletion der *Has-3* im Mausmodell zu einer verringerten intestinalen Inflammation im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis kommt und dies mit einer verringerten Gewebeerstörung einhergeht [43]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den hier gezeigten Ergebnissen.

Bislang liegen nur wenige Studien vor, die untersuchen, welcher Zelltyp maßgeblich an der gesteigerten HA-Expression in der Darmwand beteiligt ist. Der beobachtete HA-Anstieg in der Submukosa rückt Zellen in dieser Gewebeschicht, wie z.B. glatte Muskelzellen und mikroendovaskuläre Endothelzellen [63], aber auch extravasierende Entzündungszellen wie Makrophagen [61] in den weiteren Untersuchungsfokus. Kessler *et al.* konnten zeigen, dass insbesondere endotheliale Mukosazellen unter DSS-induzierter Kolitis verstärkt HA exprimieren [61]. De la Motte *et al.* beschrieben eine verstärkte HA Produktion bei *in vitro* Untersuchungen in glatten Muskelzellen von CED-Patienten [26]. Nach nun erfolgter Identifikation des maßgeblichen HAS-Isoenzyms soll eine spezifischere Charakterisierung des von der *Has3*-Defizienz am stärksten betroffenen Zelltyps das Ziel weiterführender Untersuchungen sein.

Es konnte ein signifikanter Gewichtsabfall der WT Tiere zwischen Tag 3 und 5 im Rahmen der DSS-induzierten akuten Kolitis gesichert werden (Abb.7) und liefert damit vergleichbare Ergebnisse zu anderen Forschungsgruppen [59, 62, 77], welche diesen Effekt beschreiben. Bei *Has-3* defizienten Tieren hingegen blieb eine entsprechende Veränderung des Gewichtes im Verlauf der DSS-Behandlung aus, was als protektiver Effekt zu werten ist (Abb. 7).

Während sich bei WT Tieren im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis eine signifikante Darmverkürzung zeigte, konnte diese bei *Has-3* KO Tieren inhibiert werden (Abb. 8 A). Das relative Darmgewicht zeigte sich bei beiden Behandlungsgruppen im Rahmen der akuten Kolitis gesteigert (Abb. 8 B).

Die Ergebnisse der Arbeit belegen, dass im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis bei WT Tieren ein signifikant schlechterer Kolitis-Punktescore nachweisbar war, gleichbedeutend mit einer stärkeren Kolitis. Die DSS-induzierte akute Kolitis brachte deutliche histologische Veränderungen im Rahmen des inflammatorischen Geschehens mit sich. Dabei kam es zur Einwanderung mononukleärer Zellen [26, 43, 62], einem Verlust der Kryptenstruktur [60, 78] sowie einer Verbreiterung der Submukosa [61, 79]. Die Verbreiterung der Submukosa könnte mit einer verstärkten HA- Akkumulation in Form von sogenannten HA-Kabeln [43], welche sich um die aus dem Kolongewebe isolierten glatten Muskelzellen von CED Patienten darstellten, erklärt werden [63],

Bei *Has-3* defizienten Tieren blieb jedoch histologisch eine entsprechende Schädigung der Kolonschleimhaut unter DSS weitestgehend aus. Der Kolitis-Punktescore war signifikant niedriger als der der WT Kolitis Tiere (Abb. 10). Spezifisch kam es im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis zu einer signifikanten Leukozyteninvasion innerhalb der Submukosa bei WT Tieren. In den *Has-3* defizienten Tiere war dieser Effekt inhibiert und die Tiere wiesen signifikant weniger Leukozyten im Vergleich zu WT-Tieren mit Kolitis auf (Abb. 11). Diese reduzierte Leukozyteninvasion basierte auch maßgeblich auf einem Effekt auf die Makrophagen: Während in WT-Tieren eine signifikant erhöhte Makrophageneinwanderung innerhalb der Submukosa auftrat, wurde dieser Effekt beim Isoenzym-spezifischen *Has-3* KO ebenfalls inhibiert und es lagen signifikant weniger Makrophagen im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis vor (Abb. 12). Frühere Studien belegen, dass es im Rahmen des inflammatorischen Geschehens der akuten Kolitis zu einer deutlichen Einwanderung von Leukozyten innerhalb der Dickdarmschleimhaut [7, 10], sowie zur gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine [9, 26, 80], die eine Lokomotion und Aktivierung weiterer Immunzellen fördern, kommt. Eine Extravasation von Entzündungszellen erfolgt dabei unter anderem CD44 vermittelt [67, 81], was auf eine modulierende Rolle der HA hindeutet. Die initiale Immunantwort wird dabei durch Mastzellen und Neutrophile eingeleitet [80], die

TNF- α vermittelt zu einer Aktivierung von T-Helferzellen führt, die wiederum über Sekretion diverser Zytokine die Aktivierung weiterer Immunzellen einleiten. Insgesamt decken sich die beschriebenen protektiven Effekte mit Untersuchungen von Kessler *et al.* [43].

Im Rahmen verschiedener Aktivierungsvorgänge konnte eine Bindung von Leukozyten an eine perizelluläre HA-reiche Matrix glatter Muskelzellen [63, 82] sowie intestinaler mikrovaskulärer Endothelzellen [61] gezeigt werden. Wie *de la Motte et al.* beschrieben, tragen Monozyten und Lymphozyten über diese Bindung zu der möglichen Einwanderung weiterer Entzündungszellen und –Mediatoren bei [63]. Makrophagen übernehmen durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Proteasen und Zytokinen vielfältige Aufgaben im inflammatorischen Geschehen. Ebenso interagieren sie als phagozytierende Zellen im Rahmen von Heilungsprozessen. Durch eine Phagozytose funktionsloser oder apoptotischer Zellen [83] fördern sie physiologische Heilungsprozesse [18], sorgen aber durch die Phagozytose von HA ebenso für eine Gewebeneubildung [80]. Als Antigen-präsentierende Zellen sind sie an der Aktivierung der spezifischen Immunabwehr beteiligt [18]. Die Aktivierung erfolgt zum einen zytokinvermittelt, zum anderen durch Entzündungszellen der frühen Immunantwort (s.o.). Untersuchungen im Lungengewebe zeigen, dass niedermolekulare HA Makrophagen aktiviert und die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 [31] oder IL-12 [84] steigert; entsprechende Untersuchungen im Rahmen der CED stehen derzeit noch aus. Diese HA-vermittelten Effekte könnten somit maßgeblich zu der Protektion bei einer genetischer Deletion der *Has-3* beitragen. Die reduzierte HA-Matrix bietet weitaus weniger Potential der Immunzellbindung und –rekrutierung in das Gewebe. Auch direkte proinflammatorische Effekte kurzkettiger HA-Fragmente bleiben aus und können zur deutlich abgemilderten Immunzellantwort während der akuten Kolitis in *Has-3* defizienten Tieren beitragen.

Auch die kleinen leucinreichen Proteoglykanen (*small leucine rich proteoglykans*) Biglykan und Decorin gehören der EZM-Matrix an [85]. Die Funktion dieser EZM Komponenten im Rahmen der akuten Kolitis ist bislang nicht untersucht. Jedoch macht die Modulation der HA eine Änderung auch anderer Matrixmoleküle wahrscheinlich, welche ihrerseits wieder spezifische Funktionen ausüben können.

Neben der Organisation der EZM [86, 87] erfüllen die Poretoglykane Biglykan und Decorin Aufgaben im Rahmen der Signaltransduktion während des Zellwachstums und der Differenzierung [88]. Auf der einen Seite wirken Biglykan und Decorin via TLR-2 und TLR-4 *signaling* an Lungenuntersuchungen proinflammatorisch [89]. Es liegen darüber hinaus Studien vor, die ein verringertes Auftreten der Proteoglykane mit einer verstärkten Inflammation in Verbindung bringen [85], da mögliche antiinflammatorische Effekte [87, 90] nur ungenügend vermittelt werden können. Auf der anderen Seite wirken sie über Inhibition

von C1q, dem initialen Komplementfaktor des klassischen Weges der unspezifischen Immunantwort [90, 91], wie auch über eine Bindung und Immobilisierung von TNF- α [92] antiinflammatorisch. Studien, die den Einfluss oder das Vorkommen der Proteoglykane im Rahmen der akuten Kolitis untersuchen, liegen derzeit nicht vor.

Basal wiesen *Has-3* defiziente Tiere den Trend zu mehr Biglykan Expression sowohl histologisch als auch auf mRNA Ebene auf. Im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis wurde bei *Has-3* KO Mäusen der Trend zu weniger Biglykan Expression als beim WT Tieren beobachtet (Abb. 13 A). Die mRNA Expression von Biglykan zeigt sich nach DSS-Behandlung bei beiden Versuchsgruppen in gleichem Maß reduziert (Abb. 13 B). Bislang liegen keine Studien vor, die eine *Has-3* abhängige Veränderungen der Biglykanexpression im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis beschreiben. In größeren Studien soll der Einfluss von Biglykan , welches selbst TLR-2 und -4 *signaling* vermittelt [89, 93], genauer fokussiert werden.

Der Decoringehalt beider Versuchsgruppen mit und ohne DSS-Behandlung zeigte sich immunhistochemisch unverändert (Abb. 14 A). Jedoch war auch hier der Trend zu einer verringerten mRNA Expression im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis bei beiden Behandlungsgruppen aufgetreten (Abb. 14 B). Bislang liegen keine weiteren Studien vor, die einen entsprechenden Einfluss der *Decorin* Expression unter DSS belegen. Die im Vergleich zu Biglykan deutlich moderateren Veränderungen der Expression lassen jedoch darauf schließen, dass Decorin hier wahrscheinlich keine maßgebliche Rolle spielt.

5.2 Pharmakologisch Nicht-Isoenzym-spezifische Inhibition der Hyaluronsäure-Synthese

Hinsichtlich einer möglichen pharmakologischen Modulation der HA-reichen Matrix im Rahmen der akuten Kolitis wurde im nächsten Schritt der Nicht-Isoenzym-spezifische Inhibitor 4-MU eingesetzt. Unter der Behandlung mit 4-MU konnte der Trend zu einer reduzierten HA-Expression in allen drei Darmschichten nachgewiesen werden (Abb. 15). Eine signifikante Steigerung der HA-Akkumulation im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis trat nach 5 Tagen innerhalb der Mukosa und Muskularis bei Placebo-Kolitis Tieren auf. In 4-MU behandelten Tieren hingegen war der HA-Gehalt nach der kurzen Behandlungsdauer mit DSS in der Submukosa und Muskularis im Vergleich zur Placebo behandelten Kolitisgruppe reduziert (Abb. 15 B, C).

Nach der langen DSS-Behandlungsdauer zeigten sich nur Trends der beschriebenen Effekte auf, was aller Wahrscheinlichkeit nach auf die starke Gewebeschädigung zurückzuführen ist, welche mögliche Unterschiede maskiert.

Im Zuge der DSS-Behandlung kam es bei Placebo behandelten Tieren zu einer Kolitis-typischen, moderaten Gewichtsabnahme. Im Rahmen der 4-MU-Behandlung trat jedoch weitaus schneller eine signifikante Gewichtsabnahme auf (Abb. 16). Nach der langen DSS-Behandlungsdauer war sowohl bei Placebo als auch 4-MU Tieren eine signifikante Darmverkürzung (Abb. 17 B) zu beobachten, welche sich zwischen den Behandlungsgruppen nicht unterschied. Zudem trat nach der kurzen Behandlungsdauer eine stärkere Gewichtszunahme des Kolons unter 4-MU-Behandlung gegenüber der Placebogruppe auf (Abb. 17 C). Nach der langen Behandlungsdauer waren entsprechende Effekte aufgrund der geschädigten Darmarchitektur nicht mehr zu bewerten.

Somit zeigen diese Ergebnisse, dass eine pharmakologische Nicht-Isoenzym-spezifische Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU in Bezug auf die Gewichtsabnahme, die Darmverkürzung und Zunahme des Darmgewichts negative Effekte im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis entwickelt.

Neben diesen makroskopischen Veränderungen kam es sowohl bei Placebo als auch 4-MU behandelten Tieren zu einer signifikanten Verschlechterung des histologischen Outcomes im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis. Wiederum war dieser Effekt darüber hinaus durch die 4-MU-Therapie signifikant schlechter als die der WT Kolitisgruppe nach der kurzen Behandlungsdauer. Der verschlechterte histologische Outcome zeichnete sich insbesondere durch die Abnahme der Kryptentiefe aus (Abb. 18 A, B). Nach der langen DSS-Behandlungsdauer konnte ein entsprechender Effekt nicht mehr detektiert werden

(Abb. 18 C, D). Jedoch war zu diesem Zeitpunkt die Morphologie des Kolons derart gestört, dass keine eindeutige Beurteilung mehr möglich war und mögliche Unterschiede somit nicht mehr darstellbar waren.

Zusammenfassend konnte somit im Einklang mit der verschlechterten Symptomatik und den verschlechterten makroskopischen Kriterien auch auf histologischer Ebene nur ein negatives Outcome durch eine Therapie mit 4-MU erzielt werden.

Des Weiteren liegen bislang keine Studien vor, die den Einfluss einer Nicht-Isoenzym-spezifischen pharmakologischen Inhibition der HA-Synthese auf die Immunzellinvasion im Rahmen der akuten Kolitis untersuchen.

Die unter DSS zu beobachtende signifikante Einwanderung von Leukozyten konnte unter der 4-MU-Behandlung nicht inhibiert werden (Abb. 19). Ebenso konnte eine Einwanderung von Makrophagen nicht reduziert werden (Abb. 20). Darüber hinaus zeigten lediglich die 4-MU Kolitistiere nach der langen Behandlungsdauer weiterhin eine signifikante Einwanderung von Makrophagen (Abb. 20 C). Somit konnte die 4-MU Therapie nur einen negativen Effekt auf die Einwanderung der Leukozyten und Makrophagen erzielen.

Neben der Einwanderung inflammatorischer Zellen diente die Expressionsuntersuchung unterschiedlicher proinflammatorischer Zytokine zur Beurteilung des Inflammationsgeschehens. Bereits frühere Studien konnten darstellen, dass es im Rahmen der CED zu einer Heraufregulation verschiedener proinflammatorischer Zytokine kommt [9]. TNF- α steht aktuell im Fokus therapeutischer Untersuchungen. Als Hauptvertreter für lokale und systemische Entzündungsreaktionen, wird es initial von Mastzellen und Neutrophilen exprimiert und im weiteren aktiviert über verschiedene Signalwege sowohl Lymphozyten als auch Makrophagen [80]. Im Rahmen der akuten Kolitis konnte unter anderem eine erhöhte TNF- α Expression gezeigt werden [94]. Eine TNF- α Antikörper Therapie wird derzeit als therapeutisch versuchter Ansatzpunkt genutzt. Bislang kann dadurch jedoch nur eine symptomatische Reduktion der Beschwerden bewirkt werden und zu keiner deutlichen Therapieverbesserung führen [9, 95].

Alle drei untersuchten Zytokine (*Tnf- α* , *Il-1 β* und *Mcp-1*) waren basal nur minimal exprimiert (Abb.21).

Unter DSS kam es zu einer signifikanten Expressionssteigerung von *Tnf- α* . Auch die Inhibition der HA-Synthese durch 4-MU konnte dies nicht inhibieren und somit keinen protektiven Effekt zeigen (Abb. 21 A).

IL-1 β wurde vor allem im Rahmen einer verzögerten Immunantwort eine Rolle zugesprochen, wie Untersuchungen von *Melgar*, und *Dieleman et al* zeigten, da sie eine Expressionssteigerung von *Il-1 β* im Rahmen von chronischen DSS-Kolitismodellen beschreiben [71, 96]. Auch in unserem Mausmodell der akuten Kolitis zeigte die *Il-1 β* -Expression den Trend einer gesteigerten Expression im Rahmen. Unter der 4-MU Therapie war die Expression jedoch signifikant gesteigert und 4-MU hatte somit einen eher proinflammatorischen Effekt (Abb. 21 B).

Es liegen nur wenige *in vitro* Studien vor, die eine gesteigerte Expression von MCP-1 durch HA beschreiben [31, 97]. *In vivo* war die Expression von *Mcp-1* im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis unverändert und die 4-MU Behandlung hatte keinerlei Einfluss (Abb. 21 C). Im Rahmen der DSS-Behandlung zeigte sich lediglich der Trend zu einer gesteigerten Expression von *Mcp-1*, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

Somit zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass eine pharmakologische, Nicht-Isoenzym-spezifische Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU zu einer signifikanten Steigerung der Expression von *Tnf- α* und *Il-1 β* führt. Dies wird begleitet von einer verstärkten Invasion von Immunzellen in das Darmgewebe und einer verschlechterten Symptomatik der 4-MU behandelten Kolitistiere.

Bislang liegen keine Studien vor, die Expressionsveränderungen der Proteoglykane im Rahmen einer systemischen HA-Synthesehemmung und bei Kolitis beschreiben. Wie bereits weiter oben beschrieben, konnten bei beiden Proteoglykane keine signifikanten Expressionsveränderungen im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis gezeigt werden, jedoch schien Biglykan im Rahmen der akuten Kolitis etwas deutlicher moduliert zu werden als Decorin. Inwieweit dies von funktioneller Relevanz ist, wäre das Ziel zukünftiger Studien. Auch die Nicht-Isoenzymische Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU hatte keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteoglykane (Abb. 22, 23).

Unter DSS trat eine signifikante Reduktion der Expression von *Cd44* auf. Dabei fielen keine Unterschiede zwischen Placebo und 4-MU behandelten Gruppe auf (Abb. 24).

Das HA *Signaling* im Rahmen von Entzündungsprozessen umfasst verschiedene Interaktionspartner, wobei CD44 [49] maßgeblich an der Extravasation von Entzündungszellen [67] und insbesondere der Einwanderung von CD8⁺-Lymphozyten [81] beteiligt ist. Darüber hinaus beweisen Studien, dass eine Adhäsion von Leukozyten an HA CD44-abhängig erfolgt [63, 66]. Demgegenüber stehen jedoch Studien an Mausmodellen mit E.coli Pneumonie und Bleomycin-induzierter nichtinfektiöser Lungeninflammation Lungenkrankheiten, welche eine gesteigerte HA-Akkumulation und Inflammation bei Mäusen mit einer genetischen *Cd44*-

Defizienz im inflammatorischen Geschehen postulieren [84, 98] und somit antiinflammatorische Effekte vermittelt.

Die hier beobachtete gesteigerte Immunzellinfiltration ins Gewebe trotz Reduktion der *Cd44*-Expression deutet entweder auf CD44-unabhängige Prozesse im Rahmen der akuten Kolitis hin oder zeigt, dass mögliche antiinflammatorische Effekte des Rezeptors nur ungenügend vermittelt werden können, wie Studien von Wang und Teder *et al.* nahelegen.

Als weiterer HA-spezifischer Rezeptor kam es im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis zu einer signifikanten Reduktion der *Rhamm* Expression durch die 4-MU Behandlung, wohingegen die Placebo gefütterten Tiere lediglich einen Trend zu weniger *Rhamm* Expression im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis zeigten (Abb. 25). Die verringerte Expression von *Rhamm* könnte, wie bereits in einer Studie von Tolg *et al.* beschrieben, Auswirkungen auf einen gestörten Heilungsprozess im Rahmen des inflammatorischen Prozesses der Kolitis haben, zumal RHAMM an der Motilität und Proliferation von Zellen [51] von Geweben beteiligt ist [29] und eine wichtige Funktion für die Wundheilung übernimmt [52].

Bislang gibt es allein die Möglichkeit der unspezifischen Inhibition aller HAS-Isoenzyme mittels 4-MU als therapeutische Option. Diese Möglichkeit schließt sich nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit jedoch aus, da der weitest gehende Verlust der HA-reichen Matrix im Gewebe sich als äußerst negativ zumindest während der akuten Inflammation erwiesen hat. Es kann postuliert werden, dass der HA-reichen Matrix eine essentielle Rolle zur Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion im Gewebe zukommt, welche bei einer kompletten Inhibition zu einer deutlichen Verschlechterung der Krankheitssymptomatik bei akuter Inflammation führt.

Hingegen erwies sich die spezifische Inhibition der *Has-3* als protektiv. Weiterführende Untersuchungen könnten darauf abzielen, den spezifischen Zelltyp, der für die gesteigerte HAS-3 Expression im Rahmen der akuten Kolitis verantwortlich ist, zu identifizieren und eine evtl. mögliche Zelltyp-spezifische Inhibierung der HAS-3 Synthese im weiteren therapeutisch Rahmen der akuten Kolitis zu nutzen. Bislang stehen hierfür jedoch noch keine pharmakologischen Möglichkeiten zur Verfügung.

5.3 Fazit

Unsere Untersuchungen konnten belegen, dass es im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis zu einer Heraufregulation der HA-Expression in Abhängigkeit der Behandlungsdauer kommt und diese Expression unterschiedlich in den einzelnen Darmschichten auftritt. Festzuhalten bleibt, dass sich eine selektive *Has-3* Defizienz protektiv auf die Entwicklung und den Schweregrad der DSS-induzierten Kolitis auswirkt. Dieser protektive Effekt kann durch

- a) einen signifikant geringeren Gewichtsverlust der Tiere unter akuter Kolitis,
- b) eine geringere Darmverkürzung
- c) eine Inhibition der schädigenden Effekte auf histologischer Ebene (Kolitis-Punktescore)
- d) eine signifikant verringerte Einwanderung von Leukozyten und Makrophagen

gezeigt werden.

Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass eine pharmakologische Nicht-Isoenzym-spezifische Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU negative Effekte auf die Entwicklung und den Verlauf der akuten Kolitis durch

- a) einen signifikant höheren Gewichtsabfall,
- b) ein signifikantes schlechteres histologisches Outcomes
- c) eine verstärkte Einwanderung von Leukozyten und Makrophagen
- d) signifikant gesteigerte *Tnf- α* und *Il- β* Expression

gekennzeichnet war.

Im Weiteren bleibt jedoch offen, welcher Zelltyp im Rahmen einer verringerten *Has-3* Expression protektiv wirkt. Dies soll durch weiterführende Arbeiten mit Zelltyp-spezifischen *Has-3* KO geklärt werden. Diesen Untersuchungen könnte womöglich therapeutische Relevanz in der Therapie der chronisch-inflammatorischen Darmerkrankungen zukommen.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Dignass, A., et al., [Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]. *Z Gastroenterol*, 2011. **49**(9): p. 1276-341.
2. Ott, C., et al., *The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2008. **20**(9): p. 917-23.
3. Timmer, A. and H. Goebell, *Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995--a prospective study in an urban population in Germany*. *Z Gastroenterol*, 1999. **37**(11): p. 1079-84.
4. Bokemeyer, B., et al., *Clinical status, psychosocial impairments, medical treatment and health care costs for patients with inflammatory bowel disease (IBD) in Germany: an online IBD registry*. *J Crohns Colitis*, 2013. **7**(5): p. 355-68.
5. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. *Lancet*, 2007. **369**(9573): p. 1627-40.
6. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(6): p. 417-29.
7. Gitter, A.H., et al., *Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging*. *Gastroenterology*, 2001. **121**(6): p. 1320-8.
8. Arseneau, K.O., et al., *Innate and adaptive immune responses related to IBD pathogenesis*. *Curr Gastroenterol Rep*, 2007. **9**(6): p. 508-12.
9. Jungbeck, M., et al., *Blocking lymphotoxin beta receptor signalling exacerbates acute DSS-induced intestinal inflammation--opposite functions for surface lymphotoxin expressed by T and B lymphocytes*. *Mol Immunol*, 2008. **45**(1): p. 34-41.
10. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
11. Nicholls, J., N.J. Mortensen, and A. Tottrup, *[Surgery for colitis ulcerosa and Crohn's disease in the era of modern medical therapy]*. *Ugeskr Laeger*, 2011. **173**(14): p. 1050-2.
12. Zhao, X., et al., *Efficacy and Safety of Beclomethasone Dipropionate versus 5-Aminosalicylic Acid in the Treatment of Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *PLoS One*, 2016. **11**(8): p. e0160500.
13. Rousseaux, C., et al., *Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. *J Exp Med*, 2005. **201**(8): p. 1205-15.
14. Laurent, T.C., *Biochemistry of hyaluronan*. *Acta Otolaryngol Suppl*, 1987. **442**: p. 7-24.
15. Henry, C.B. and B.R. Duling, *Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(2 Pt 2): p. H508-14.
16. Toole, B.P., T.N. Wight, and M.I. Tammi, *Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 4593-6.
17. Legendijk, A.K., et al., *Hyaluronan: a critical regulator of endothelial-to-mesenchymal transition during cardiac valve formation*. *Trends Cardiovasc Med*, 2013. **23**(5): p. 135-42.
18. Noble, P.W., *Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair*. *Matrix Biol*, 2002. **21**(1): p. 25-9.
19. Feinberg, R.N. and D.C. Beebe, *Hyaluronate in vasculogenesis*. *Science*, 1983. **220**(4602): p. 1177-9.
20. Deed, R., et al., *Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan*. *Int J Cancer*, 1997. **71**(2): p. 251-6.
21. Bollyky, P.L., et al., *Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2007. **179**(2): p. 744-7.
22. McBride, W.H. and J.B. Bard, *Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytotoxicity*. *J Exp Med*, 1979. **149**(2): p. 507-15.

23. Day, A.J. and C.A. de la Motte, *Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation?* Trends Immunol, 2005. **26**(12): p. 637-43.
24. Stern, R., *Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway.* Eur J Cell Biol, 2004. **83**(7): p. 317-25.
25. West, D.C., et al., *Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid.* Science, 1985. **228**(4705): p. 1324-6.
26. de la Motte, C.A., *Hyaluronan in intestinal homeostasis and inflammation: implications for fibrosis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **301**(6): p. G945-9.
27. McKee, C.M., et al., *Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor kappaB-dependent mechanism.* J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 8013-8.
28. Tammi, M.I., A.J. Day, and E.A. Turley, *Hyaluronan and homeostasis: a balancing act.* J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4581-4.
29. Taylor, K.R., et al., *Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4.* J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17079-84.
30. Termeer, C., et al., *Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4.* J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 99-111.
31. McKee, C.M., et al., *Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44.* J Clin Invest, 1996. **98**(10): p. 2403-13.
32. Powell, J.D. and M.R. Horton, *Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal.* Immunol Res, 2005. **31**(3): p. 207-18.
33. Itano, N., et al., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties.* J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 25085-92.
34. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases.* J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
35. Prehm, P., *Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Characterization of the synthase.* Biochem J, 1983. **211**(1): p. 181-9.
36. Weigel, P.H., G.M. Fuller, and R.D. LeBoeuf, *A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing.* J Theor Biol, 1986. **119**(2): p. 219-34.
37. Calabro, A., et al., *Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells: predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients.* Blood, 2002. **100**(7): p. 2578-85.
38. Mack, J.A., et al., *Enhanced inflammation and accelerated wound closure following tetraphorbol ester application or full-thickness wounding in mice lacking hyaluronan synthases Has1 and Has3.* J Invest Dermatol, 2012. **132**(1): p. 198-207.
39. Kosaki, R., K. Watanabe, and Y. Yamaguchi, *Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity.* Cancer Res, 1999. **59**(5): p. 1141-5.
40. Camenisch, T.D., et al., *Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme.* J Clin Invest, 2000. **106**(3): p. 349-60.
41. Arranz, A.M., et al., *Hyaluronan deficiency due to Has3 knock-out causes altered neuronal activity and seizures via reduction in brain extracellular space.* J Neurosci, 2014. **34**(18): p. 6164-76.
42. Bai, K.J., et al., *The role of hyaluronan synthase 3 in ventilator-induced lung injury.* Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(1): p. 92-8.
43. Kessler, S.P., D.R. Obery, and C. de la Motte, *Hyaluronan Synthase 3 Null Mice Exhibit Decreased Intestinal Inflammation and Tissue Damage in the DSS-Induced Colitis Model.* Int J Cell Biol, 2015. **2015**: p. 745237.
44. Laurent, T.C. and J.R. Fraser, *Hyaluronan.* FASEB J, 1992. **6**(7): p. 2397-404.

45. Harada, H. and M. Takahashi, *CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5597-607.
46. Afify, A.M., et al., *Purification and characterization of human serum hyaluronidase*. Arch Biochem Biophys, 1993. **305**(2): p. 434-41.
47. Lepperdinger, G., B. Strobl, and G. Kreil, *HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22466-70.
48. Yoshida, H., et al., *Murine homologue of the human KIAA1199 is implicated in hyaluronan binding and depolymerization*. FEBS Open Bio, 2013. **3**: p. 352-6.
49. Aruffo, A., et al., *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate*. Cell, 1990. **61**(7): p. 1303-13.
50. Lesley, J., et al., *CD44 in inflammation and metastasis*. Glycoconj J, 1997. **14**(5): p. 611-22.
51. Nedvetzki, S., et al., *RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: a different interpretation of redundancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(52): p. 18081-6.
52. Tolg, C., et al., *Rhamm^{-/-} fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair*. J Cell Biol, 2006. **175**(6): p. 1017-28.
53. Kakizaki, I., et al., *A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33281-9.
54. Kultti, A., et al., *4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3*. Exp Cell Res, 2009. **315**(11): p. 1914-23.
55. Stacchino, C., R. Spano, and A. Pettiti, *Spasmolytic activity of some 4-methylumbelliferone derivatives*. Boll Chim Farm, 1983. **122**(3): p. 158-60.
56. Fontaine, L., et al., *[Choleretic, spasmolytic and general pharmacologic activities of 4-methylumbelliferone]*. Therapie, 1968. **23**(1): p. 51-62.
57. KG, D.G.C., *Fachinfo Cholespamin^P forte*, 2003. p. 2.
58. Muller, J., et al., *Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 2014. **109**(6): p. 440.
59. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 694-702.
60. Kitajima, S., S. Takuma, and M. Morimoto, *Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis*. J Vet Med Sci, 1999. **61**(1): p. 67-70.
61. Kessler, S., et al., *Hyaluronan (HA) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation*. Clin Transl Sci, 2008. **1**(1): p. 57-61.
62. Zheng, L., T.E. Riehl, and W.F. Stenson, *Regulation of colonic epithelial repair in mice by Toll-like receptors and hyaluronic acid*. Gastroenterology, 2009. **137**(6): p. 2041-51.
63. de la Motte, C.A., et al., *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, 2003. **163**(1): p. 121-33.
64. Chen, H., M. Mahaseth, and Y. Zhang, *Hyaluronic acid as a rescue therapy for trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis through Cox-2 and PGE2 in a Toll-like receptor 4-dependent way*. J Zhejiang Univ Sci B, 2011. **12**(9): p. 712-9.
65. Bonder, C.S., et al., *Use of CD44 by CD4⁺ Th1 and Th2 lymphocytes to roll and adhere*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4798-806.
66. Evanko, S.P., et al., *Hyaluronan-dependent pericellular matrix*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(13): p. 1351-65.
67. Mohamadzadeh, M., et al., *Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion*. J Clin Invest, 1998. **101**(1): p. 97-108.
68. Stenson, W.F., *Hyaluronic acid and intestinal inflammation*. Curr Opin Gastroenterol, 2010. **26**(2): p. 85-7.

69. Kiene, L.S., et al., *Deletion of Hyaluronan Synthase 3 Inhibits Neointimal Hyperplasia in Mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(2): p. e9-16.
70. Hibi, T., H. Ogata, and A. Sakuraba, *Animal models of inflammatory bowel disease*. *J Gastroenterol*, 2002. **37**(6): p. 409-17.
71. Melgar, S., A. Karlsson, and E. Michaelsson, *Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. **288**(6): p. G1328-38.
72. Wirtz, S., et al., *Chemically induced mouse models of intestinal inflammation*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(3): p. 541-6.
73. Weigmann, B., et al., *Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(10): p. 2307-11.
74. Lahat, G., et al., *Immunomodulatory effects of ciprofloxacin in TNBS-induced colitis in mice*. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. **13**(5): p. 557-65.
75. Nagy, N., et al., *Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis*. *Circulation*, 2010. **122**(22): p. 2313-22.
76. Ahrenstedt, O., et al., *Increased luminal release of hyaluronan in uninvolved jejunum in active Crohn's disease but not in inactive disease or in relatives*. *Digestion*, 1992. **52**(1): p. 6-12.
77. Yan, Y., et al., *Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis*. *PLoS One*, 2009. **4**(6): p. e6073.
78. Cooper, H.S., et al., *Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis*. *Lab Invest*, 1993. **69**(2): p. 238-49.
79. Bandyopadhyay, S.K., et al., *Hyaluronan-mediated leukocyte adhesion and dextran sulfate sodium-induced colitis are attenuated in the absence of signal transducer and activator of transcription 1*. *Am J Pathol*, 2008. **173**(5): p. 1361-8.
80. Nathan, C., *Points of control in inflammation*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 846-52.
81. DeGrendele, H.C., P. Estess, and M.H. Siegelman, *Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site*. *Science*, 1997. **278**(5338): p. 672-5.
82. Majors, A.K., et al., *Endoplasmic reticulum stress induces hyaluronan deposition and leukocyte adhesion*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(47): p. 47223-31.
83. Vivers, S., I. Dransfield, and S.P. Hart, *Role of macrophage CD44 in the disposal of inflammatory cell corpses*. *Clin Sci (Lond)*, 2002. **103**(5): p. 441-9.
84. Wang, Q., et al., *CD44 deficiency leads to enhanced neutrophil migration and lung injury in Escherichia coli pneumonia in mice*. *Am J Pathol*, 2002. **161**(6): p. 2219-28.
85. Iozzo, R.V., *The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(27): p. 18843-6.
86. Ameye, L., et al., *Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis*. *FASEB J*, 2002. **16**(7): p. 673-80.
87. Tufvesson, E. and G. Westergren-Thorsson, *Biglycan and decorin induce morphological and cytoskeletal changes involving signalling by the small GTPases RhoA and Rac1 resulting in lung fibroblast migration*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 23): p. 4857-64.
88. Weber, C.K., et al., *Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines*. *Gastroenterology*, 2001. **121**(3): p. 657-67.
89. Schaefer, L., et al., *The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(8): p. 2223-33.
90. Groeneveld, T.W., et al., *Interactions of the extracellular matrix proteoglycans decorin and biglycan with C1q and collectins*. *J Immunol*, 2005. **175**(7): p. 4715-23.
91. Sjoberg, A.P., et al., *Short leucine-rich glycoproteins of the extracellular matrix display diverse patterns of complement interaction and activation*. *Mol Immunol*, 2009. **46**(5): p. 830-9.
92. Tufvesson, E. and G. Westergren-Thorsson, *Tumour necrosis factor-alpha interacts with biglycan and decorin*. *FEBS Lett*, 2002. **530**(1-3): p. 124-8.

93. O'Neill, L.A., *Toll-like receptor signal transduction and the tailoring of innate immunity: a role for Mal?* Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 296-300.
94. Alex, P., et al., *Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis.* Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(3): p. 341-52.
95. Hisamatsu, T., et al., *Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease.* Pharmacol Ther, 2013. **137**(3): p. 283-97.
96. Dieleman, L.A., et al., *Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines.* Clin Exp Immunol, 1998. **114**(3): p. 385-91.
97. Beck-Schimmer, B., et al., *Hyaluronan induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in renal tubular epithelial cells.* J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(12): p. 2283-90.
98. Teder, P., et al., *Resolution of lung inflammation by CD44.* Science, 2002. **296**(5565): p. 155-8.