

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

**Untersuchung des Einflusses einer zelltypspezifischen Deletion der  
Hyaluronsäuresynthase 3 auf die Entwicklung und den Verlauf der  
akuten Kolitis im Mausmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jacqueline Rimpler (geboren Simone)

2020

## Angabe der Referenten

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Zweitgutacher: Prof. Dr. med. Timm J. Filler

## Zusammenfassung

### Untersuchung des Einflusses einer zelltypspezifischen Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3 auf die Entwicklung und den Verlauf der akuten Kolitis im Mausmodell

Die Ätiologie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) ist multifaktoriell. In der akuten Entzündungsphase kann Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA) als Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM) sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken. Die Bildung von HA erfolgt über die Hyaluronsäuresynthasen (*HAS*)-1, -2 und -3. Es hat sich gezeigt, dass die ubiquitäre Deletion (*Knockout*, *KO*) der *Has3* protektive Effekte auf die Kolitis hat. Die *HAS3* wird in vielen Zelltypen exprimiert, unter anderem in glatten Muskel-, Endothel- und Epithelzellen des Darms. Es ist nicht eindeutig geklärt, welcher Zelltyp ursächlich an den proinflammatorischen *HAS3*-Effekten beteiligt ist. Ziel dieser Arbeit war daher die Identifikation des Zelltyps, der in die protektiven Effekte im Rahmen der Kolitis involviert ist.

Die akute Kolitis wurde durch orale Gabe von Dextrannatriumsulfat (*dextran sodium sulfate*, DSS) in Mäusen mit zelltypspezifischem genetischem *KO* der *Has3* in glatten Muskel-, Endothel- oder intestinalen Epithelzellen und deren Kontrollgruppen induziert. Analysiert wurden der Schweregrad der sich entwickelnden Kolitis anhand von Gewichtsverläufen, dem Quotient aus Darmgewicht und -länge sowie die Blutbildern der Tiere nach sechs Tagen DSS. Zudem erfolgte eine histologische und immunhistochemische Beurteilung des Schweregrades und der immunologischen Komposition des entzündeten Kolongewebes.

Die Ergebnisse zeigten bei Mäusen mit einem endothelzellspezifischem *Has3-KO* eine abgemilderte Kolitis, wie mittels histochemischer Beurteilung der Darmmorphologie ersichtlich wurde. Zudem verloren die *KO*-Mäuse dieser Gruppe signifikant weniger Gewicht unter der Kolitis und es konnte im Blutbild ein Trend zur verminderten Leukozytenzahl gefunden werden. Im Kolongewebe zeigte sich eine signifikant geringere Leukozyten- und Makrophagenanzahl. Im Gegensatz dazu schien ein *Has3-KO* in den glatten Muskelzellen sogar proinflammatorisch zu wirken. In der Gruppe mit *Has3-KO* in den Epithelzellen konnte kein Effekt beobachtet werden.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit der protektive Effekt des ubiquitären *Has3-KO* durch einen *KO* der *Has3* in den Endothelzellen wiedergespiegelt und identifiziert somit Endothelzellen als kritische Mediatoren der HA-vermittelten Protektion im Rahmen der akuten Kolitis. Dies könnte ein Ansatzpunkt weiterer Forschung zur Verbesserung der Therapie von CED sein.

## Summary

### **Analysis of the influence of a cell-type specific inactivation of the hyaluronic acid synthesis 3 during acute colitis in mice**

The aetiology of inflammatory bowel disease is multifactorial. Being part of the extracellular matrix, hyaluronic acid (*hyaluronan*, HA) can act both pro- and anti-inflammatory in the state of acute colitis. HA is synthesized by hyaluronic acid synthesis (*HAS*)-1, -2 and -3. Former studies were able to show a benefit in acute colitis by a ubiquity *Has3*-deletion (*Knockout*, *KO*). *HAS3* is expressed by many different cell-types, for example by intestinal smooth muscle cells, epithelial and endothelial cells. It is still unknown, which cell-type is accountable for the proinflammatory effect of the *HAS3*. Therefore, the aim of this study is to identify the responsible cell-type.

A dextran sodium sulphate (DSS) based colitis model was used to initiate acute colitis in mice. These mice had a cell-type specific genetic *Has3-KO* concerning the smooth muscle cells, epithelial cells or endothelial cells. The colitis was induced in all *Has3-KO* mice and in their control group. The analysis included weight loss during colitis, a colon weight/length quotient and the estimation of circulating leukocytes on day 6 of DSS colitis. Moreover, the colitis was evaluated by histological and immunohistochemical methods, including a colitis score and an analysis of the immunological composition of inflamed intestinal tissue.

The results showed a less severe colitis in mice having a *Has3-KO* in the endothelial cells. This was estimated with a histological colitis score in intestinal tissue. Furthermore, compared to their control group, these mice lost significantly less weight and showed a tendency to fewer circulating leucocytes in their blood. Under immunohistochemical scrutiny a less distinctive number of leucocytes and macrophages could be seen. These protective effects on acute colitis could not be observed in the other groups. In contrast, a *Has3-KO* in smooth muscle cells even seemed to have a proinflammatory effect.

In summary, it can be said, that the protective effects of a ubiquity *Has3-KO* in acute colitis can be reflected by a *Has3-KO* in the endothelial cells. This could be important for further therapeutic research.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>5-ASA</b>	5-Aminosalizylate	<b>LMM</b>	Lamina muscularis muscosae
<b>10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	1000 pro Kubikmillimeter	<b>LP</b>	Lamina propria
<b>BGW</b>	Bindegewebe	<b>LYVE-1</b>	<i>lymphatic vessel endothelial HA receptor 1</i>
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin	<b>M</b>	Mukosa
<b>CD44,-45</b>	<i>cluster of differentiation 44,-45</i>	<b>mM</b>	Millimolar
<b>CED</b>	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	<b>mRNA</b>	<i>messenger ribonucleic acid, messenger</i> Ribonukleinsäure
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>n</b>	Anzahl
<b>CRP</b>	C-Reaktives Protein	<b>NF-κB</b>	<i>nuclear factor-κB</i>
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin	<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
<b>dest.</b>	destilliert	<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>EC</b>	<i>endothelial cells</i> , Endothelzellen	<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>EZM</b>	Extrazellulärmatrix	<b>LM</b>	Lamina muscularis
<b>FBS</b>	Fetales Bovines Serum	<b>LMM</b>	Lamina muscularis muscosae
<b>g</b>	Gramm	<b>LF</b>	Lymphfollikel
<b>g/cm</b>	Gramm pro Zentimeter	<b>RHAMM</b>	<i>receptor for HA-mediated motility</i>
<b>GDWA</b>	gesamter Darmwandabschnitt	<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species, oxidativer Stress</i>
<b>HA</b>	<i>hyaluronic acid, hyaluronan</i> , Hyaluronsäure/-n	<b>SEM</b>	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
<b>HARE</b>	<i>hyaluronic acid receptor for endocytosis</i>	<b>SM</b>	Submukosa
<b>Has 1,2,3</b>	murine Hyaluronsäuresynthase 1, 2, 3	<b>SMC</b>	<i>smooth muscle cells</i> , glatte Muskelzellen
<b>HAS 1,2,3</b>	humane Hyaluronsäuresynthase 1, 2, 3	<b>SPERM1</b>	<i>sperm adhesion molecule 1</i>
<b>HBD2</b>	<i>antimicrobial peptide human β-defensin 2</i>	<b>TB</b>	Trispuffer
<b>HCl</b>	Salzsäure	<b>TBS</b>	Tris gepufferte Kochsalzlösung
<b>HIMECs</b>	<i>Human Intestinal Microvessel Endothelial Cells</i>	<b>TGF-β</b>	<i>transforming growth factor β</i>
<b>HPH-20</b>	<i>Human PH-20</i>	<b>TLR-2, -4</b>	<i>Toll-like</i> Rezeptor 2, 4
<b>HYAL1,-2,-3</b>	Hyaluronidase 1, 2, 3	<b>TNBS</b>	Trinitrobenzene sulphonic acid
<b>ICAM-1</b>	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>	<b>TNF-α</b>	Tumornekrosefaktor-α
<b>IL-1,-6</b>	Interleukin -1, -6	<b>UDP-GlcNAc</b>	Uridin-Diphosphat-N-Acetyl-D-Glukosamin
<b>KO</b>	<i>Knockout</i>	<b>UDP-GlcUA</b>	Uridin-Diphosphat-D-Glukuronsäure
<b>LF</b>	Lymphfollikel	<b>VCAM-1</b>	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
<b>LM</b>	Lamina muscularis	<b>Villin</b>	enterale Epithelzellen
<b>LMM</b>	Lamina muscularis muscosae	<b>WT 1, 2</b>	Wildtyp, WT 1, 2

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Histologischer Aufbau der Darmwand .....	6
Abb. 2 Strukturformel der Hyaluronsäure.....	8
Abb. 3 Synthese der Hyaluronsäure .....	9
Abb. 4 Der protektive Effekt einer ubiquitären Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3.....	17
Abb. 5 Generierung des zelltypspezifischen Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3 .....	27
Abb. 6 Induktion der Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3 und der Kolitis.....	29
Abb. 7 Auswertungsbereich .....	33
Abb. 8 Aufbau der Darmwand für die histologische Auswertung.....	34
Abb. 9 Signifikant geringere Gewichtsabnahme bei Mäusen mit endothelzellspezifischem Defizit der Hyaluronsäuresynthase 3.....	39
Abb. 10 Erhöhter Darmgewicht/-länge Quotient bei Defizit der Hyaluronsäuresynthase 3 in den glatten Muskelzellen.....	40
Abb. 11 Trend zu geringeren Leukozytenzahl bei den Mäusen mit zelltypspezifischem Defizit der Hyaluronsäuresynthase 3 in den Endothelzellen .....	41
Abb. 12 Niedrigerer Kolitis-Score bei endothelzelltypischer Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3...	42
Abb. 13 Geringere Leukozyteninvasion bei Mäusen mit endotheliale Defizit der Hyaluronsäuresynthase 3.....	44
Abb. 14 Signifikant geringere Makrophageninfiltration bei endothelspezifischer Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3.....	45
Abb. 15 Zusammenhang von Endothelzellen, Thrombozyten und Hyaluronsäure bei akuten Entzündungen .....	53
Abb. 16 Die Rolle der endothelialen Hyaluronsäuresynthase 3 bei akuter Kolitis .....	59

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Lösungen und Substanzen für die Gewebepräparation und Histochemie.....	22
Tabelle 2 Farbstoffe .....	23
Tabelle 3 Arzneimittel und Substanzen für Behandlung der Tiere.....	23
Tabelle 4 Primärantikörper .....	23
Tabelle 5 Sekundärantikörper .....	24
Tabelle 6 Geräteliste .....	24
Tabelle 7 Software .....	25
Tabelle 8 Auflistung aller Tiere.....	26
Tabelle 9 Kolitis-Score .....	35

# Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen.....	1
1.1.1	Symptome.....	1
1.1.2	Pathogenese.....	2
1.1.3	Therapieoptionen.....	2
1.1.3.1	Pharmakotherapie.....	3
1.1.3.2	Remissionserhaltung.....	5
1.2	Aufbau der Darmwand.....	6
1.3	Extrazelluläre Matrix.....	7
1.4	Hyaluronsäure.....	7
1.4.1	Vorkommen.....	8
1.4.2	Aufbau der Hyaluronsäure.....	8
1.4.3	Synthese der Hyaluronsäure.....	8
1.4.3.1	Hyaluronsäuresynthasen.....	9
1.4.3.2	Hyaluronsäuresynthase 1.....	10
1.4.3.3	Hyaluronsäuresynthase 2.....	10
1.4.3.4	Hyaluronsäuresynthase 3.....	11
1.4.4	Hyaluronidasen und KIAA1199.....	11
1.4.5	Funktionen der Hyaluronsäure.....	13
1.5	Rolle der Hyaluronsäure bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.....	15
1.5.1	Interaktion von Hyaluronsäure und intestinalen glatten Muskelzellen.....	17
	bei einer akuten Kolitis.....	17
1.5.2	Einfluss von Hyaluronsäure auf intestinale Epithelzellen während einer akuten Kolitis.....	18
1.5.3	Die Bedeutung von intestinalen Endothelzellen und Hyaluronsäure bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	19
1.6	Ziele der Arbeit.....	21
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Lösungen, Substanzen und Farbstoffe für die Gewebepreparation, Histochemie und die Behandlung der Tiere.....	22
2.1.2	Primärantikörper.....	23
2.1.3	Sekundärantikörper.....	24
2.1.4	Geräte.....	24
2.1.5	Software.....	25
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Tiere und Tierversuchsgenehmigung.....	26
2.2.2	Generierung der verschiedenen Mauslinien.....	27
2.2.2.1	Gefäßendothelspezifisch exprimierende <i>Cre</i> -Maus ( <i>end-SCL-Cre-ER<sup>T</sup></i> ).....	28
2.2.2.2	Glattmuskulär-spezifisch exprimierte <i>Cre</i> Maus ( <i>SMA-Cre-ER<sup>T2</sup></i> ).....	28
2.2.2.3	Epithelzellspezifisch exprimierte <i>Cre</i> Maus ( <i>Villin-Cre-ER<sup>T2</sup></i> ).....	28
2.2.3	Induktion der Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3 und der Kolitis.....	29
2.2.4	Organentnahme und Blutabnahme.....	29
2.2.5	Schneiden und Hitzefixieren.....	30
2.2.6	Färbungen.....	30
2.2.6.1	Hämalaun und Eosin.....	30
2.2.6.2	Immunhistochemische Färbungen: Anti-Mac2 und Anti-CD45.....	31
2.3	Auswertung.....	33
2.3.1	Gewichtsverlauf.....	33
2.3.2	Beurteilung von Darmgewicht und -länge.....	33
2.3.3	Kolitis-Score.....	33
2.3.4	Area Fraction mittels ImageJ bei immunhistochemischen Färbungen.....	36
2.3.5	Statistik.....	36
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Bewertung der Schwere der Kolitis.....	38
3.1.1	Gewichtsverlauf unter Kolitis.....	38
3.1.2	Makroskopische Beurteilung von Darmgewicht und -länge.....	40
3.2	Inflammation.....	41
3.2.1	Zirkulierende Leukozyten.....	41

3.2.2 Gewebeständige Inflammation .....	42
3.2.2.1 Histologische Auswertung der Schwere der Kolitis .....	42
3.2.2.2 Gewebeständige Leukozyten .....	43
4 Diskussion .....	47
4.1 Effekte der zelltypspezifischen Deletion der <i>Has3</i> in den glatten Muskelzellen oder Epithelzellen auf die akute Kolitis .....	48
4.2 Protektiver Effekt der endothelzellspezifischen Deletion der <i>Has3</i> .....	49
4.3 Limitationen der Arbeit und Ausblick.....	56
4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen .....	59
Literatur- und Quellenverzeichnis.....	60



# 1 Einleitung

## 1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Zu den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gehören Erkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Die Prävalenz dieser Erkrankungen liegt in Europa bei 1/198 für Colitis ulcerosa und bei 1/310 für Morbus Crohn. Beide Erkrankungen sind weltweit verbreitet, wobei die meisten Betroffenen in Europa und Nordamerika leben. Zudem wurde in den letzten Jahren eine steigende Prävalenz weltweit beobachtet, wobei die höchste jährliche Inzidenz in Europa verzeichnet wurde. Häufig manifestieren sich CED bereits im frühen Erwachsenenalter und sind somit individuell von großer Bedeutung [1]. Die Ätiologie von CED ist multifaktoriell und noch nicht abschließend geklärt. Bisher wird angenommen, dass es sich um ein komplexes Zusammenspiel von Umweltfaktoren, genetischer Disposition und einer fehlgeleiteten Immunreaktion handelt [2]. Im Rahmen der Immunantwort scheinen auch Faktoren der Extrazellulärenmatrix (EZM) eine Rolle zu spielen.

### 1.1.1 Symptome

CED wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ähneln sich in Ihrer klinischen Symptomatik, so dass die Differenzierung schwierig sein kann. Die Leitsymptome beider Erkrankungen sind Bauchschmerzen und Diarrhöen. Im Gegensatz zum Morbus Crohn, bei welchem die Diarrhöen in der Regel schleimig sind, zeigen die Diarrhöen bei der Colitis ulcerosa häufig Blutbeimengungen. Die Entzündung der Darmschleimhaut kann bei Morbus Crohn diskontinuierlich den gesamten Magen-Darm-Trakt befallen, wohingegen die entzündlichen Veränderungen im Rahmen der Colitis ulcerosa kontinuierlich vor allem das Kolon, meist mit Beginn im Rektum, betreffen. Auch endoskopisch und histologisch können beide Erkrankungen differenziert werden. Die Darmwand von Patient/-innen mit Morbus Crohn zeigt typischerweise ein Pflastersteinrelief und Fistelbildungen mit Befall aller Darmwandschichten, wohingegen bei der Colitis ulcerosa oft ulzeröse Schleimhautveränderungen und Kryptenabszesse zu sehen sind. Beiden Erkrankungen ist gemein, dass sie häufig extraintestinale Komorbiditäten, wie Arthralgien, Arthritiden, Hautveränderungen und Entzündungen der Augen aufweisen. Diese sind tendenziell häufiger beim Morbus Crohn als bei der Colitis ulcerosa

nachzuweisen [3]. Bei der Colitis ulcerosa wiederum gibt es eine höhere Koinzidenz mit der Primärsklerosierende Cholangitis [4] und ein höheres Risiko für Kolorektale Karzinome [5]. Die Lebensqualität der Betroffenen ist meist erheblich eingeschränkt [6].

### **1.1.2 Pathogenese**

Die Pathogenese von CED ist multifaktoriell. Es handelt sich vermutlich um ein Zusammenspiel von genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und einer fehlgeleitenden Immunantwort. Zu den genetischen Komponenten, die den Erkrankungsprozess beeinflussen, zählt man z.B. eine Mutation im *NOD2*- Gen, ein Gen, was für die Erkennung von Bakterien von Bedeutung ist [1]. Eine *NOD2*-Mutation hätte demnach eine Schwäche in der antimikrobiellen Abwehr des Darmgewebes zur Folge. Des Weiteren beeinflussenden Umweltfaktoren, wie z.B. Rauchen und Antibiotikagaben, das Erkrankungsgeschehen und können Einfluss auf die Therapie haben. Ein weiterer interessanter Ansatz besteht in der Vermutung, dass es sich um eine übermäßige Immunantwort auf die physiologische Darmflora handeln könnte [7]. Im Zustand der akuten Entzündung oder auch bei epithelialer Dysfunktion kommt es zur Beschädigung und zum Untergang der Epithelzellen, so dass mikrobiotische Organismen direkt mit dem darunterliegenden Darmgewebe interagieren können. Durch diese Interaktionen können weitere Immunantworten ausgelöst und unterhalten werden [8]. Des Weiteren spielt eine Dysfunktion in der Angiogenese möglicherweise eine wichtige Rolle [9].

### **1.1.3 Therapieoptionen**

Im Rahmen der chronischen Entzündungen kann es bei beiden Erkrankungen zu akuten Krankheitsschüben kommen. Diese sind z.B. bei der Colitis ulcerosa durch Tenesmen, blutige Diarrhöen und imperativen Stuhlgang gekennzeichnet. Für die Entscheidung welche Therapieoptionen bevorzugt gewählt werden sollten, spielen neben der Symptomintensität, der Krankheitsverlauf und das endoskopische Befallsmuster, wie z.B. Proktitis, Linksseitencolitis oder Pancolitis, eine Rolle. Ebenso muss auf extraintestinale Organmanifestationen geachtet werden. Der Wille des Betroffenen darf bei der Therapieplanung nicht außer Acht gelassen werden. Ob die Therapie ambulant oder stationär durchgeführt wird, hängt von verschiedenen

Faktoren ab und bedarf einer individuellen Abwägung. Ziel der Therapie sollte dabei sein, schnellst möglich eine Remission zu erreichen und diese möglichst ohne den Einsatz von Steroiden erhalten zu können [6].

### 1.1.3.1 Pharmakotherapie

Ziel der medikamentösen Therapie ist eine Reduktion der Entzündungsreaktion, wofür verschiedene Ansatzpunkte mit entsprechenden Medikamenten zur Verfügung stehen. Der wichtigste Ansatzpunkt in der medikamentösen Therapie ist die Beeinflussung und Suppression der Immunreaktion. Zu den medikamentösen Optionen gehören Glukokortikoide, weitere Immunsuppressiva wie Azathioprin (6-Mercaptopurin), 5-Aminosalicylsäure-Derivate (5-ASA, z.B. Mesalazin, Sulfasalazin), Calcineurin-Inhibitoren (z.B. Tacrolimus, Ciclosporin A) und Antikörper z.B. gegen *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ , z.B. Infliximab, Adalimumab, Golimumab), Antikörper gegen Integrine (z.B. Vedolimumab) oder Inhibitoren der Januskinasen (z.B. Tofacitinib). Diese sollten frühzeitig gegen eine operative Therapie abgewogen werden. Die aktualisierte S3-Leitlinie für Colitis ulcerosa der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten empfiehlt ein den Krankheitsstadien angepasstes Vorgehen [6, 10]:

Eine unkomplizierte Kolitis mit Proktitis kann beispielsweise mit einer topischen Therapie mit 5-ASA-Suppositorien, alternativ -Schaum oder -Einläufe behandelt werden, wobei der Einsatz eines Suppositorium zunächst bevorzugt werden sollte. Hierbei konnte eine Remissionsinduktion anhand klinischer, endoskopischer und histologischer Kriterien beobachtet werden [11]. Eine orale Einnahme von 5-ASA kann ebenfalls erwogen werden und bei nicht ausreichendem Ansprechen kann zusätzlich ein topisches Steroid angewendet werden [12]. Dahingegen sollten Patient/-innen mit einer Linksseitencolitis oder einer leicht- bis mittelgradig ausgeprägten Pancolitis bereits initial eine Kombinationstherapie aus topisch und oral applizierten 5-ASA-Präparaten erhalten, da sich in diesen Fällen eine Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie überlegen zeigte [13]. Bei einem ausbleibenden Ansprechen der Therapie kann diese durch die zusätzliche systemische Glukokortikoid-Gabe eskaliert werden.

Bei Vorliegen eines schweren akuten Schubs der Colitis ulcerosa sollte eine stationäre Therapie, möglichst in einem spezialisierten Zentrum, erfolgen. Ein schwerer Schub kann nach Empfehlung der aktuellen deutschen Leitlinie von 2018 (Aktualisierung 2019) anhand der Kriterien von Truelove und Witts [14] diagnostiziert werden.

Hierzu gehören:

- Schwere Diarrhöen mit 6 oder mehr makroskopischen blutigen Stühlen pro Tag
- Fieber mit mittlerer Temperatur am Abend  $> 37,5^{\circ}\text{C}$  oder Temperatur  $> 37,8^{\circ}\text{C}$  an wenigstens 2 von 4 Tagen
- Tachykardie mit einem Puls  $>90/\text{min}$
- Anämie mit einem Hämoglobin-Wert  $<75\%$  der Norm
- Blutsenkungsgeschwindigkeit  $> 30 \text{ mm/h}$

In diesem Fall sollten bereits initial systemische Glukokortikoide, z.B. Prednisolon, eingesetzt werden [14]. Diese können oral oder bei eingeschränkter gastrointestinaler Aufnahme auch intravenös verabreicht werden. Sollten Kontraindikationen gegen eine Glukokortikoidtherapie bestehen oder es zur Intoleranz gegen Glukokortikoide kommen, können alternativ Medikamente wie der TNF- $\alpha$  Antikörper Infliximab [15], dieser vorzugsweise in Kombination mit einem Thiopurin, Calcineurin-Inhibitoren wie z.B. Ciclosporin A [16] oder Tacrolimus [17] zum Einsatz kommen. Darüberhinaus hat seit kurzem auch der Januskinase-Inhibitor Tofacitinib eine Bedeutung in der Induktionstherapie sowie in der Remissionserhaltung der Colitis ulcerosa erlangt [18]. Im Falle einer fulminanten Colitis kann Tofacitinib jedoch aufgrund fehlender Studiendaten aktuell noch nicht empfohlen werden. Die genannten Immunsuppressiva kommen ebenfalls bei steroidrefraktärem Verlauf zum Einsatz. Eine operative Therapie im Sinne einer Koloproktomie sollte ebenso frühzeitig als Alternative erwogen werden [6, 10].

Bei Patient/-innen mit einem steroidabhängigen Verlauf der Colitis ulcerosa sollte die Behandlung mit einem Thiopurin oder TNF-Antikörpern, mit Vedolizumab oder mit Tofacitinib eingeleitet werden. Bei der Substanzwahl spielen verschiedene Faktoren eine Rolle: Aktivität der Erkrankung, Patientenalter und Begleiterkrankungen sowie Wünsche des Betroffenen, potenzielle Nebenwirkungen, Kosten der Behandlung sowie die persönliche Erfahrung des betreuenden Fachpersonals in der Anwendung der entsprechenden Substanzen.

Zusätzlich wird eine Thromboseprophylaxe empfohlen, da im akuten Schub ein erhöhtes Risiko für Thromboembolien unabhängig von anderen Risikofaktoren besteht. Dieses ist einerseits begründet durch die unter Inflammation bestehende Hyperkoagulabilität mit Aktivierung der Gerinnungskaskade und Thrombozytenaggregation als auch durch die Immobilität der Patient/-innen in der akuten Erkrankungsphase [19]. Neben der entzündungshemmenden Therapie sollte auch eine symptomorientierte Therapie durchgeführt werden. Hierzu gehört z.B. eine entsprechende Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution sowie die Ernährung bei Malnutrition. Durch die immunsuppressive Therapie kommt es vermehrt zu Infektionen, in deren Rahmen auch insbesondere atypische Erreger in Betracht kommen, so dass diesen Erkrankungen eine vermehrte Aufmerksamkeit gewidmet werden sollte. Ob eine begleitende prophylaktische antibiotische Therapie sinnvoll ist, konnte jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden [6].

### **1.1.3.2 Remissionserhaltung**

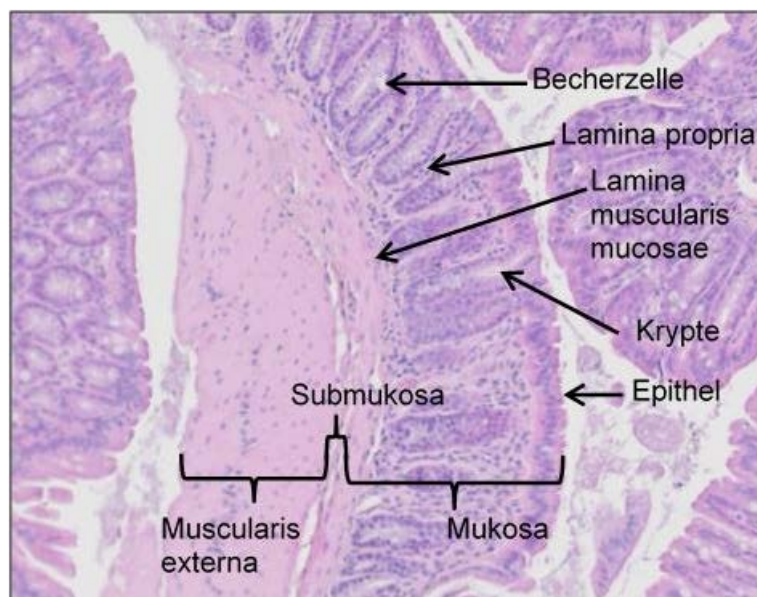
Bei der Remissionserhaltung wird die Auswahl der eingesetzten Medikamente u.a. nach der Schwere des Krankheitsverlaufs ausgewählt. Bei leichten, unkomplizierten Verläufen wird zur Remissionserhaltung zunächst ein 5-ASA-Präparat, wie z.B. Mesalazin, oral oder bei distalem Befall rektal empfohlen [20]. Auch eine Kombination der Applikationswege ist teilweise sinnvoll. Sollte Mesalazin nicht vertragen werden, kann eine Therapie mit E.coli Nisse erwogen werden [21]. Bei Auftreten eines erneuten Schubs unter der remissionserhaltenden Therapie sollte neben der Eskalation der Dosierung des 5-ASA-Präparates auch eine Kombinationstherapie z.B. mit einem Thiopurin, mit TNF-Antikörpern oder mit Vedolizumab diskutiert werden. Patient/-innen mit einem kompliziertem Verlauf der Colitis ulcerosa werden in der Remissionserhaltung z.B. bei nicht ausreichendem Ansprechen auf 5-ASA oder bei steroidabhängigem Verlauf häufig mit Thiopurinen behandelt. Diese können teilweise schon bei Ansprechen einer Induktionstherapie überlappend eingesetzt werden, so dass eine mögliche Verzögerung des Wirkungseintritts anderer Substanzen überbrückt werden kann. Sollten TNF-Antikörper, Vedolizumab oder Tofacitinib bereits in der Induktionstherapie erfolgreich eingesetzt worden sein, sollte diese Therapie beibehalten werden. Glukokortikoide sollten zur Remissionserhaltung nicht

angewendet werden. Die notwendige Dauer der Anwendung der Substanzen zum Remissionserhalt kann bisher nur unzureichend abgeschätzt werden [10].

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Therapieoptionen bisher hauptsächlich auf der Suppression der Immunantwort beruhen. Eine kausale Therapie ist derzeit nicht möglich, was sicherlich auch darin begründet ist, dass die Ätiologie der CED bisher nicht ausreichend geklärt werden konnte und a.e. auf einem multifaktoriellen Geschehen beruht. Um verstehen zu können in wie weit die einzelnen Bestandteile der Darmwand im Entzündungsgeschehen agieren und dieses beeinflussen, sollen im Folgenden der genaue Aufbau und die Funktion der einzelnen Darmwandschichten beleuchtet werden.

## 1.2 Aufbau der Darmwand

Die Darmwand besteht aus verschiedenen Schichten mit unterschiedlich spezialisierten Epithel- und Stromazellen (Abb. 1). Zum Lumen des Darmrohrs hin befindet sich das Darmepithel. Diese Epithelzellen haben den ersten Kontakt zu im Lumen befindlichen Nahrungsbestandteilen und auch der mikrobiologischen Flora. Das Epithel hat unter anderem die Aufgabe Nährstoffe und Wasser zu resorbieren und bildet eine natürliche Barriere für Krankheitserreger.



**Abb. 1 Histologischer Aufbau der Darmwand**

Das Bild zeigt einen in Hämalaun und Eosin gefärbten Darmwandabschnitt in 200-facher Vergrößerung mit dem typischen Aufbau der Darmwand. Zusehen sind die zum Lumen hinreichenden Epithelzellen. Diese bedecken die Krypten. Darunter liegt die Lamina propria als unterste Sicht der Mukosa. Es schließt sich die Submukosa mit Gefäßen und Nervenzellen an sowie anschließend die Muskularis externa.

In der darunterliegenden Basalmembran dominieren strukturelle Elemente wie Kollagene, Laminine und Proteoglykane [22]. Im gesunden Gewebe stellen die Epithelzellen des Darms außerdem eine schützende Barriere vor Bakterien und anderen Mikroorganismen für die darunterliegende Mukosa dar [23]. Im Rahmen von Entzündungsprozessen kann es zur Schädigung und sogar zur Zerstörung von Epithelzellen kommen, so dass die darunterliegenden Strukturen nicht mehr geschützt sind. Die Lamina muscularis mucosae trennt Mukosa von Submukosa. Hier befinden sich vor allem Lymph- und Blutgefäße sowie Nervenplexus. Zudem befinden sich in diesem Bereich, teilweise in die Mukosa reichend, auch Lymphfollikel, die der Immunabwehr dienen. Im Entzündungsgeschehen wird die Submukosa aufgelockert und verbreitert [24]. Unter die Submukosa schließt sich die Quer- und Längsmuskulatur an. Zwischen den einzelnen Zellen befindet sich die EZM, diese nimmt eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation und -Interaktion ein und beeinflusst das Entzündungsgeschehen.

### **1.3 Extrazelluläre Matrix**

Der Zwischenraum der Zellen wird durch die EZM ausgefüllt. Hierzu gehören verschiedene Proteine und Kohlenhydrate, welche von Zellen wie Fibro-, Osteo- und Chondroblasten sowie von Epithel-, Endothel- und glatten Muskelzellen gebildet werden. Die Strukturen und Funktionen dieser Bestandteile hängen u.a. von den bildenden Zellen ab. Den größten Anteil an der EZM haben die Glykosaminoglykane, wie z.B. Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA), Chondroitinsulfate, Heparinsulfat und Keratansulfat [25, 26].

### **1.4 Hyaluronsäure**

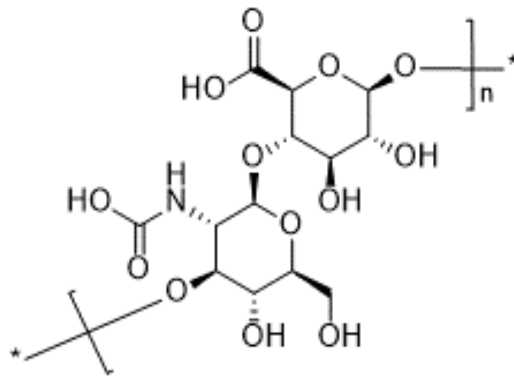
Als Bestandteil der EZM kommt HA ubiquitär im Körper von Säugetieren und auch einigen Bakterien vor [26]. Trotz der einfachen Struktur aus unverzweigten Disachariden nimmt HA eine wichtige Rolle in der Proliferation, Migration und Kommunikation von Zellen sowie bei Entzündungen, Wundheilung, Angiogenese und Tumorwachstum ein [27].

### 1.4.1 Vorkommen

Fast die Hälfte der HA des menschlichen Körpers befindet sich in der EZM der Haut. Weiterhin kommt HA in der Synovialflüssigkeit von Gelenken, im Glaskörper des Auges, aber auch in der EZM des Magen-Darm-Trakts, der Nieren, des Herzens und der Lunge vor. Je nach Gewebe unterscheiden sich die Anforderungen an die HA [28].

### 1.4.2 Aufbau der Hyaluronsäure

HA besteht aus einer langen unverzweigten Kette von Disacchariden, die aus  $\beta$ -1-3-glykosidisch verknüpften D-Glucuronsäuren und N-Acetyl-D-Glucosaminen gebildet werden (Abb.2). Das molekulare Gewicht kann bis zu  $10^7$  Dalton erreichen, wobei die Länge der Kette stark variiert und mit einer Funktionsänderung einhergehen kann. Im Gegensatz zu andern Glykosaminoglykanen, wie z.B. Heparin oder Keratansulfat, enthält HA keine Sulfat- Gruppen und gehört nicht zu den Bestandteilen von Proteoglykanen. Auch finden sich Unterschiede hinsichtlich der Biosynthese [26].



**Abb. 2 Strukturformel der Hyaluronsäure**

Unverzweigte Kette aus Disacchariden, bestehend aus  $\beta$ -1-3-glykosidisch verknüpften D-Glucuronsäuren und N-Acetyl-D-Glucosaminen.

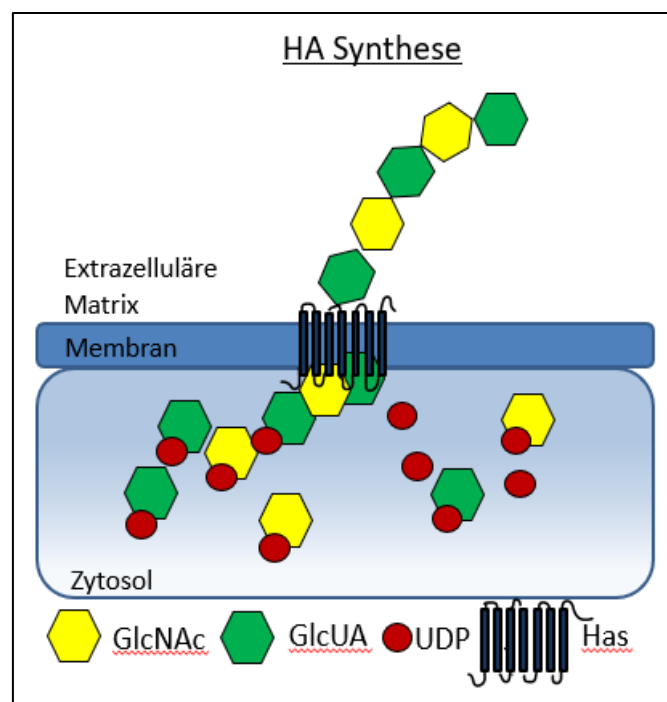
### 1.4.3 Synthese der Hyaluronsäure

HA wird nicht an ein Kernprotein gebunden, da die Synthese nicht im endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Apparat stattfindet, sondern an der Plasmamembran der Zellen. Hier befinden sich die homologen Hyaluronsäuresynthasen (HAS)-1, -2 und -3 [29]. Diese synthetisieren die Polymerketten und transferieren sie in den Extrazellarraum [30], wo sie durch die Hyaluronidasen (HYAL)-1,-2 oder -3 modifiziert werden. Zu den HA bildenden Zellen des Magen-Darmsystems gehören unter anderem glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen [31-33].



### 1.4.3.1 Hyaluronsäuresynthasen

Nach aktuellem Kenntnisstand besitzen Säugetiere drei verschiedene *HAS*. Die für die einzelnen *HAS* kodierenden Gene befinden sich unabhängig voneinander auf unterschiedlichen Chromosomen: die humane *HAS1* auf Chromosom 19q13.3, die *HAS2* auf 8q24.12 und die *HAS3* auf 16q22.1 [34]. Sie werden zu bestimmten Zeitpunkten in sämtlichen Geweben abhängig von verschiedenen Anforderungen exprimiert. Dazu gehören Prozesse der Entwicklung, Alterung, Wundheilung, unter physiologischen Bedingungen oder pathologischen Umständen, wie z.B. bei der Tumorgenese [35]. Außerdem produzieren die *HAS* unterschiedlich lange Polymerketten [36]. *HAS* sind transmembranöse Enzyme, welche für die Initiierung der HA-Synthese keinen exogener *Primer* benötigen. Die *HAS* benötigen für die HA-Synthese die an Uridin-Diphosphat (UDP) gebundenen Zuckersubstrate N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) und D-Glucuronsäure (GlcUA) sowie das Elektrolyt Magnesium (Abb. 3) [37]. Die Kettenverlängerung findet hierbei am reduzierenden Ende statt.



**Abb. 3 Synthese der Hyaluronsäure**

Die Hyaluronsäuresynthasen (*Has*) sind membranständige Enzyme, die HA (*hyaluronic acid*, HA) direkt in den Extrazellulärraum ausschleusen. Für die Synthese benötigt werden die Bausteine Uridin-Diphosphat (UDP), N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) und D-Glucuronsäure (GlcUA). Die Abbildung wurde in Anlehnung an Triggs-Raine 2015 [37] erstellt.

Das Enzym besitzt mindestens sieben bindende und funktionelle Einheiten, die zur Kettenelongation benötigt werden. Die HA-Polymerkette wird anschließend nach extrazellulär freigesetzt [38]. Zu den Faktoren, die die Synthese regulierenden Faktoren zählen Cholesterin und verschiedene Phospholipide der Zellmembran [39]. Des Weiteren hängt die Synthase-Aktivität direkt mit der Menge an Ausgangssubstrat zusammen. Umso mehr Zuckersubstrate sich in der Zelle befinden, umso mehr HA wird gebildet. Die Regulation in Säugetierzellen ist jedoch wesentlich komplexer, besonders in Bezug auf die Kontrolle der Transkription und Translation [40]. Hier scheint eine Phosphorylierung der *HAS* zu einer Verringerung der Aktivität zu führen. Ebenso haben Ubiquitinierung und Dimerisierung Einfluss auf die Enzymaktivität [41].

#### 1.4.3.2 Hyaluronsäuresynthase 1

Bisher bekannt sind drei verschiedene *HAS*. Im Gegensatz zu den beiden anderen Synthasen befindet sich die *HAS1* vor allem intrazellulär und kommuniziert mit der Plasmamembran. Zusätzlich benötigt sie zur Aktivierung der Synthese von HA sehr hohe Konzentrationen der Zuckersubstrate [42]. Im Vergleich zu *HAS2* und *HAS3* formt die *HAS1* kleinere perizelluläre Schichten aus Hyaluronsäure [36]. Die Transkription der *HAS1* wird unter anderem durch den *transforming growth factor β* (TGF-β) in Zellen der Synovia reguliert [43, 44]. Eine gesteigerte Expression von *HAS1* findet sich in inflammatorischer Umgebung, z.B. bei Lungenentzündungen, Arteriosklerose und Arthritiden. Ebenso findet sich vermehrte *HAS1*-Aktivität bei Karzinomen der Blase und der Prostata sowie beim Mesotheliom [45]. Zudem spielt sie neben der *HAS3* eine Rolle bei der Differenzierung des Keratins und der Homöostase der Haut [46].

#### 1.4.3.3 Hyaluronsäuresynthase 2

Der genetische Deletion der *HAS2* hat im Gegensatz zur *HAS1* und *HAS3* verheerende Folgen für die Entwicklung des Embryos. Im Mausmodell resultieren aus einer genetischen *Has2*-Defizienz schwere Herz- und Gefäßmissbildungen, die zum Tod des Embryos führen [47]. Es ist beschrieben worden, dass bei einem Kind mit Herzklappenfehler auch eine erniedrigte Aktivität der *HAS2* vorlag [48]. Während der embryonalen Entwicklung sind die *HAS2*-Spiegel im Gewebe am höchsten. Hier scheint sie demnach am meisten von Bedeutung zu sein. Im Gegensatz dazu findet

sich die *HAS3* eher im adulten Gewebe [42]. Neben der embryonalen Entwicklung der Herzklappen, spielt die *HAS2* auch beim Knorpel- und Knochenwachstum eine wichtige Rolle. Mäuse, bei denen eine Deletion der *Has2* in den mesenchymalen Zellen durchgeführt wurde, entwickeln viel kürzere Gliedmaßen als ihre Wildtypen. Ursache hierfür könnte eine reduzierte Anzahl an hypertrophen Chondrozyten in den Versuchstieren sein [49]. Eine besondere Form der *HAS2* wurde im Nacktmull gefunden. Hier konnte der Tausch zweier Aminosäuren (Asparagin gegen Serin) nachgewiesen werden. Die durch diese *HAS2* synthetisierte langkettige, hochmolekulare HA ist ca. 5-fach länger als beim Menschen. Darüber hinaus zeigte sich eine verringerte Aktivität der HA-abbauenden HYAL2. Der Nacktmull ist bekannt dafür eine sehr lange Lebenserwartung zu haben (circa 30 Jahre) und scheint resistent gegenüber Tumoren zu sein [50].

#### **1.4.3.4 Hyaluronsäuresynthase 3**

Im Zentrum dieser Arbeit steht die *HAS3*. 1999 konnten Itano et al beobachten, dass sie unter *in vitro* Bedingungen im Vergleich zu *HAS1* und *HAS2* eher kurzkettige, niedermolekulare HA ( $10^2$ - $10^6$  Dalton) zu produzieren scheint. Hier konnte auch beobachtet werden, dass sich die Moleküllänge der produzierten HA *in vitro* und *in vivo* unterschieden [36]. Der Phänotyp von Mäusen mit Defizit der *Has3* ist weitestgehend unauffällig. Lediglich in einer Studie wurde eine bessere Resistenz gegenüber beatmungsassoziierten Pneumonien im Mausmodell gezeigt [51]. In neueren Studien wurden zudem Veränderungen der EZM im Gehirn bei *Has3*-defizienten Mäusen gefunden. Sie zeigten ein engeres Neuronen-Netzwerk mit erhöhter elektrischer Aktivität bis hin zu epileptischen Anfällen. Beim Menschen ist bisher kein Zusammenhang von verminderter *HAS3*-Aktivität und Epilepsie bekannt [52]. Der detaillierte Zusammenhang von *HAS3* und Kolitis wird in einem eignen Kapitel behandelt.

#### **1.4.4 Hyaluronidasen und KIAA1199**

Täglich wird circa ein Drittel der gesamten HA im Körper ausgetauscht. Die Halbwertszeit der HA hängt vom jeweiligen Gewebe ab: In Gelenken sind es circa ein bis drei Wochen [53], im Blut nur zwei bis fünf Minuten [54]. Der Abbau von HA findet zu circa 30 % am Ort der Synthese statt. Im Blut vorkommende HA wird von der Leber

oder den Nieren verstoffwechselt. Der größte Anteil wird jedoch im lymphatischen System, v.a. in den Lymphknoten, abgebaut. Nur 10% der HA werden über Rezeptoren der Leber-Sinusoid-Zellen aufgenommen und dort degradiert. Für die Endozytose der HA sind verschiedene Rezeptoren u.a. der *cluster of differentiation 44* (CD44)-Rezeptor, der *lymphatic vessel endothelial HA receptor 1* (LYVE-1) [55] auf lymphatischen Endothelzellen und der *hyaluronic acid receptor for endocytosis* (HARE) [56, 57] von Bedeutung. Nach Endozytose von HA beginnt der Abbau durch eine HYAL [58].

Im Genom von Säugetieren existieren sechs verschiedene Sequenzen, die für HYAL kodieren. Sie werden nach ihrem Reaktionsmechanismus in drei Gruppen eingeteilt. Die HYAL der Eukaryoten gehören zu den Endo- $\beta$ -Acetyl-Hexosaminidasen und bedienen sich der Hydrolyse. In Bakterien bauen HYAL neue Bindungen ein und gelten als Lyasen. Die letzte Gruppe sind die in Blutegel vorkommenden Glukuronidasen. Die eukaryontischen HYAL sollen hier näher besprochen werden [59].

Am meisten Bedeutung für den Menschen haben die HYAL1 und die HYAL2. Für beide gilt, dass ihre Affinität zu HA und die Reaktionszeit von der Moleküllänge der HA abhängt. HYAL2 ist über Glykophosphatidyloinositol in der Zellmembran von verschiedenen Zelltypen, z.B. Thrombozyten, verankert und im Lysosom lokalisiert, wo sie hochmolekulare HA ( $10^6$ - $10^7$  Dalton) zu einer Molekülgröße von circa 20.000 Dalton verkleinert [60, 61]. Sie trägt sowohl zum intrazellulären als auch zum extrazellulären Abbau von HA bei. In den Lysosomen befindet sich außerdem die HYAL1. Diese kann die HA-Fragmente zu noch kleineren Molekülen spalten, bis hin zu Tetrasacchariden [59, 61]. Angriffspunkt der HYAL sind hierbei die  $\beta$ -1,4-glykosidischen Verbindungen der HA [59]. Ebenso gehört zu den HYAL die für die Fertilisation wichtige *Human PH-20* (HPH-20) und *sperm adhesion molecule 1* (SPERM1) [59]. In der Literatur sind vier Personen mit einem HYAL1-Defizit beschrieben, die eine Mucopolysaccharidose IX mit vornehmlich Gelenkfehlbildungen entwickelt haben [37, 62]. Die Bedeutung der HYAL3 ist bisher noch weitgehend unklar.

Ein weiteres Enzym, welches für den Abbau von HA verantwortlich ist, ist das von Fibroblasten produzierte KIAA1199. Es konnte gezeigt werden, dass Darmfibroblasten von Patient/-innen mit Morbus Crohn vermehrt KIAA1199 produzieren und in die EZM freisetzen [63]. KIAA1199 kann HA unabhängig vom CD44-Rezeptor zu kleineren, proinflammatorischen Fragmenten abbauen. Stimuliert wird die Produktion des KIAA1199 durch eine autokrine Sekretion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin 6 (IL-6) [63].

#### **1.4.5 Funktionen der Hyaluronsäure**

Je nach Gewebe und Anforderungen hat HA verschiedene Funktionen inne. Hierbei ist unter anderem auch die Länge der HA-Fragmente und die Interaktion mit der Umgebung von Bedeutung. Aufgrund des strukturellen Aufbaus ist HA in der Lage die Wasserverteilung und -bewegung im Körper zu beeinflussen und spielt daher eine zentrale Rolle in der Wasserhomöostase des Körpers. Im Extrazellulärraum sind die Carboxyl-Gruppen der HA komplett ionisiert und im Verhältnis zur Molekülgröße ist HA überdurchschnittlich osmotisch aktiv. Dies ist von besonderer Bedeutung in Geweben, die viel Wasser binden, wie z.B. im Glaskörper des Auges [64]. Eine weitere Funktion der HA kommt vor allem in der Synovia von Gelenken und Bursae zum Tragen. Die Viskosität von 1%-HA-Lösung ist bei einer niedrigen Scherrate circa 500.000-mal so groß wie die von Wasser. Bei hoher Scherrate kann sie jedoch um das 1000-fache sinken. Diese Eigenschaft bewirkt, dass bei schnellen Bewegungen eines Gelenkes die Viskosität der Synovia wesentlich geringer ist als bei langsamen Bewegungen. Außerdem wird bei schnellen Bewegungen die Elastizität erhöht, somit werden Rückstellkräfte generiert, die Energie sparen [26, 64]. Besonders hoch ist die Konzentration von HA während der Embryogenese. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer genetischen Defizienz der *Has2* noch intrauterin auf Grund von Fehlbildungen versterben [47]. Weiterhin ist bekannt, dass HA eine wichtige Funktion bei der Wundheilung einnimmt. Die vom Wundrand her einwandernden Keratinozyten sezernieren direkt nach der Initiierung der Wundheilung verstärkt HA [65, 66]. Über ein positives Feedback fördert HA nun die eigene Synthese und unterstützt die Zell-Zell-Interaktion von Keratinozyten und Fibroblasten. Diese ist für die Wundheilung

unerlässlich. Ob HA auch die Differenzierung der Keratinozyten beeinflussen kann, ist bisher nicht eindeutig geklärt [66].

Darüber hinaus kann HA über verschiedene oberflächliche und intrazelluläre Rezeptoren zur Zell-Zell-Interaktion beitragen. Über diese Rezeptoren wird u.a. die Zellmigration und -proliferation gesteuert. Einer der wichtigsten Rezeptoren ist der transmembranäre CD44-Rezeptor. Dieser Rezeptor kommt auf verschiedenen Zellen vor, z.B. auf Leukozyten, Thrombozyten und Fibroblasten. Er ist wichtig für die Zellsignalübertragung und für die Endozytose von HA sowie für die Funktion der *HAS2*. Außerdem spielt er auch bei der Adhäsion von Leukozyten in kleinen Blutgefäßen [67] sowie bei der Interaktion von Monozyten und an glatte Muskelzellen gebundene HA eine zentrale Rolle [49]. Bindet HA an den CD44-Rezeptor wird eine Signalkaskade induziert. Die diversen intrazellulären Signalwege führen über Guanosintriphosphat-Moleküle zur Aktivierung von Tyrosinkinase und zur Transkription von *nuclear factor-κB* (NFκB). Dies ist ein Transkriptionsfaktor, der die Zellproliferation fördert [68, 69]. Es konnte gezeigt werden, dass nur die niedermolekulare HA zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB führt, nicht jedoch die hochmolekulare HA ( $10^6$ - $10^7$  Dalton). Diese scheint sogar die Transkription zu hemmen [70]. Weitere wichtige Oberflächenrezeptoren sind der LYVE-1 und HARE auf lymphatischen Endothelzellen [55, 57] sowie die *Toll-like Rezeptoren* (TLR) - 2 und -4 [27]. Die Interaktion von HA mit Zelloberflächenrezeptoren führt in der Regel zur Proliferation und Migration der Zellen. Das könnte ein Grund sein, warum ein Überangebot an HA *in vitro* und im Mausmodell eine maligne Entartung fördern und zu schnellerem Tumorstadium führen kann [71]. Intrazellulär kann HA außerdem an den *receptor for HA-mediated motility* (RHAMM) binden. Dieser befindet sich jedoch auch auf der Zelloberfläche und die genaue Funktion in Bezug auf die Bindung von HA ist noch nicht ausreichend geklärt [72]. In Bezug auf das kleinzellige Bronchialkarzinom konnte gezeigt werden, dass ein höheres Vorkommen von HA und seinem Rezeptor RHAMM mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Es gibt bereits Ansätze den Signalweg über RHAMM zu beeinflussen, um die Tumorentstehung zu hemmen [73].

Besonders interessant ist die Wirkung von HA auf das Entzündungsgeschehen in Abhängigkeit von der Moleküllänge. Es wurde postuliert, dass HA je nach

Fragmentlänge sogar entgegengesetzte Wirkungen haben kann [74]. So wurde gezeigt, dass hochmolekulare HA der Angiogenese entgegen wirkt, wobei niedermolekulare HA eher proangiogenetisch ist [75]. *In vitro* produziert vor allem die *HAS3* niedermolekulare HA, wie mehrere Versuche zeigen konnten [36, 76, 77]. Ob dies jedoch auch die Situation *in vivo* widerspiegelt, ist unklar. Hinzu kommt, dass die Verteilung der molekularen Masse der HA zudem durch die Zellumgebung beeinflusst wird [76]. So kann HMWHA durch HYAL und oxidativen Stress (*reactive oxygen species*, ROS) zu niedermolekulare HA modifiziert werden. Neben der Angiogenese unterdrückt hochmolekulare HA auch Entzündungsreaktionen und die Zelldifferenzierung. niedermolekulare HA bewirkt hier eine gegenteilige Reaktion [59]. Im Entzündungsgeschehen interagiert die niedermolekulare HA über die oben genannten Rezeptoren unter anderem mit Leukozyten. Diese können nun proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 und IL-6 sowie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und NF- $\kappa$ B, freisetzen [78-80]. Diese fördern wiederum eine Immunantwort. Der Zusammenhang von HA, *HAS*, insbesondere der *HAS3* und CED soll im Folgenden genauer betrachtet werden.

## **1.5 Rolle der Hyaluronsäure bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen**

Die Ätiologie von CED ist bisher nicht abschließend geklärt. Wie oben bereits erwähnt, handelt es sich wahrscheinlich um ein Zusammenspiel aus verschiedenen Faktoren, wobei u.a. HA als Bestandteil der EZM von Bedeutung ist. In mehreren Versuchen konnte bei Entzündungsreaktionen vermehrt HA nachgewiesen werden. Dies betrifft auch CED, wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa [31]. Die Zusammenhänge sind hier jedoch komplexer und sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Es ist bekannt, dass Veränderungen der HA-Zusammensetzung entzündlichen Prozessen, wie z.B. der Einwanderung von Leukozyten vorausgeht [31]. Mit der strukturellen Veränderung der HA ändert sich auch die Funktion. HA, v.a. niedermolekulare HA, kann proinflammatorisch wirken und die Entzündungsreaktion fördern und unterhalten. Auch die im Gewebe vorkommenden Synthesen spielen eine wichtige Rolle. Dies konnte die Arbeitsgruppe von Kessler *et al.* bereits in einem Mausmodell zeigen. Hierbei wurde in der Gruppe mit Deletion der *Has3* eine weniger

ausgeprägte Entzündung im Darm beobachtet. Eine kombinierte Deletion der *Has1* und *Has3* zeigte den gleichen Effekt, jedoch nicht die alleinige Deletion der *Has1*. Die Auswirkungen einer Deletion der *HAS2* wurde in diesem Ansatz nicht untersucht. Des Weiteren wurden als Maß der Schwere der Kolitis die Gewichtsabnahme, die IL-6 Plasmakonzentration und die Krankheitsaktivität anhand klinischer Marker sowie histochemische und immunhistochemische Auswertungen herangezogen [24]. Bei *Human Intestinal Microvessel Endothelial Cells* (HIMECs) von Patient/-innen mit CED, die durch TNF- $\alpha$  stimuliert wurden, konnten erhöhte Mengen an *HAS3 messenger ribonucleic acid* (*messenger* Ribonukleinsäure, mRNA) nachgewiesen werden [78]. An diesen Zellen bildeten sich kabelähnliche HA-Strukturen, an welche sich wiederum Leukozyten angebunden hatten.

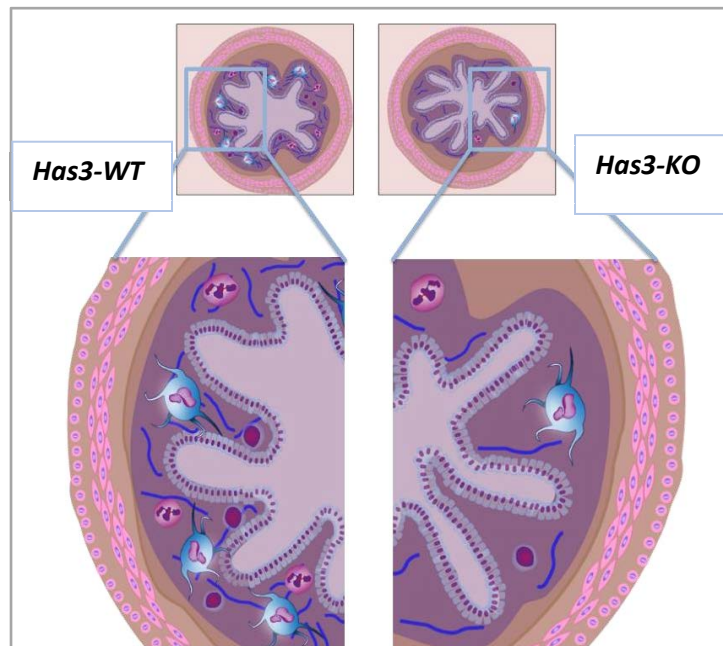
Unsere Arbeitsgruppe verwendete im Rahmen von Vorversuchen einen tierexperimentellen Versuchsansatz, der auf den Arbeiten von Anette von Glinzki aufbaute [81]. Hierbei wurde ebenfalls ein DSS-Kolitis-Mausmodell eingesetzt, bei dem auf genetischer Ebene die *Has3* ubiquitär entfernt wurde. Diese *Has3*-defizienten Mäuse hatten eine deutlich mildere Kolitis als ihre Kontrollgruppe. Dies zeigte sich in der histologischen und immunhistologischen Untersuchung des Darms, wobei ein Punktesystem, der sog. *Kolitis-Score*, zur Ermittlung der Krankheitsaktivität etabliert wurde.

Zudem wiesen die Mäuse mit *Has3*-Defizit einen geringeren Gewichtsverlust und eine geringere Kolonverkürzung auf. Auch die Invasion von Entzündungszellen war geringer ausgeprägt. Diese Effekte sind in Abb. 4 dargestellt.

Hingegen führte ein Ansatz mit einem Nicht-Isoenzym-spezifischen Inhibitor der Synthasen durch 4-Methylumbeliferon zu einem signifikant erhöhtem *Kolitis-Score*, einem vermehrten Gewichtsverlust und zu einer signifikant gesteigerten Einwanderung von Entzündungszellen, wie Makrophagen. Diese unspezifische Synthesehemmung ging zudem einher mit einer gesteigerten Expression von TNF- $\alpha$  und IL-1. Da die *HAS3* in verschiedenen Zelltypen exprimiert wird, war nun die Frage, welcher Zelltyp für die proinflammatorische Wirkung bei einer akuten Kolitis



verantwortlich sein könnte. Hierfür kommen mehrere Zelltypen in Frage, welche im Folgenden näher erläutert werden.



**Abb. 4 Der protektive Effekt einer ubiquitären Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3**

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der protektiven Wirkung eines ubiquitären *Knockout* (KO) der Hyaluronsäuresynthase 3 (*Has3*) im Vergleich zum Wildtyp (*WT*). Im Darmquerschnitt der *Has3-KO* Mäuse ist geringere Verbreiterung des Lamina propria zu sehen. Hier zeigen sich weniger eingewanderte Immunzellen und auch das Vorkommen von Hyaluronsäure ist geringer ausgeprägt. Zudem ist zu erkennen, dass die Krypten im Darm der *Has3-KO* Mäuse nicht verkürzt sind.

### 1.5.1 Interaktion von Hyaluronsäure und intestinalen glatten Muskelzellen bei einer akuten Kolitis

Zu den Veränderungen, die während einer akuten Entzündung im Darmgewebe ablaufen, gehören u.a. die Hyperplasie der glatten Muskelzellen der Lamina muscularis mucosae und die Einwanderung von Leukozyten. De la Motte *et al.* konnten zeigen, dass durch Viren stimulierte glatte Muskelzellen des Darms HA produzieren. Zudem veränderte diese HA nach circa 17 Stunden unter der viralen Stimulation ihre Form und bildete kabelähnliche Strukturen, an welche vermehrt Leukozyten adhärten. Die übrigen Leukozyten schienen über *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) direkt an die Oberfläche der glatten Muskelzellen zu binden. Nach Stimulation durch proinflammatorische Zytokine fanden sich keine kabelähnlichen Strukturen. An die konstitutiv unter physiologischen Bedingungen von glatten Muskelzellen hergestellte Form der HA binden die Leukozyten nicht [33]. Später konnte diese Arbeitsgruppe darüber hinaus zeigen, dass für die Interaktion der glatten

Muskelzellen und der von ihnen gebildeten HA der CD44-Rezeptor von Bedeutung ist [31]. In histologisch aufgearbeiteten Proben von Patient/-innen mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa fand die Arbeitsgruppe eine enge räumliche Beziehung zwischen den glatten Muskelzellen der Lamina muscularis mucosae und der dort vorhandenen HA [31].

### 1.5.2 Einfluss von Hyaluronsäure auf intestinale Epithelzellen während einer akuten Kolitis

Betrachtet man die Darmschleimhaut von Patient/-innen mit CED ist schnell zu erkennen, dass eine Barriere-Störung vorliegt. Die Störung des Epithels kann hierbei sowohl Ursache als auch Folge der CED sein. Das Darmepithel setzt sich aus mehreren Zellen zusammen. Hierzu gehören z.B. die semipermeablen Epithelzellen, die Mucin-produzierenden Becherzellen, die Enteroendokrinenzellen und die Paneth'schen-Körner-Zellen. Bei entzündeten Darmabschnitten ist diese Zusammensetzung gestört. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bei Patienten mit CED in den entzündeten Abschnitten des Darms weniger Becherzellen vorhanden sind. Zudem werden weniger Defensine von den Paneth'schen-Körner-Zellen produziert und es liegt eine verringerte Dichte der schützenden Mukosaschleimschicht vor [82-84]. Auch die Permeabilität der Epithelschicht ist gesteigert [85]. Diese wird normalerweise über die Anzahl an *Tight junctions* der *Zonula occludens* geregelt. In einem Versuchsansatz von Kim *et al.* konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass durch die Applikation von HA (35.000 Dalton) die intestinalen Epithelzellen vermehrt *zonula occludens proteine 1* produzieren, welche benötigt werden, um mehr *Tight junctions* auszubilden. Darüber hinaus konnten mit *Citrobacter rodentium* infizierte Mäuse durch die Applikation von HA vor einer schweren Infektion geschützt werden [86]. Die intestinale Barriere wird durch die Applikation von HA zudem gestärkt. Dies geschieht durch eine Expression von *antimicrobial peptide human  $\beta$ -defensin 2* (HBD2) in den intestinalen Epithelzellen [87]. Die schützende Funktion von diesen Epithelzellen wird unter anderem über die Aktivierung des TLR4 und der dadurch induzierten der Cyclooxygenase 2 mit der Produktion von Prostaglandin 2 vermittelt. Ein Ligand des TLR4 ist neben bakteriellen Bestandteilen auch HA [88]. HA ist auch in der menschlichen Muttermilch enthalten und scheint ebenso über den TLR4 und den CD44-Rezeptor des Darmepithels zu

einem Schutz des kindlichen Magen-Darm-Traktes vor Bakterien zu führen. Dieser Effekt scheint durch HBD2 vermittelt zu werden [89]. Außerdem gibt es einen Zusammenhang zwischen bakterieller Fehlbesiedlung und CED [7, 8]. Die intestinalen Epithelzellen werden mittlerweile als signalvermittelnde Zellschicht gesehen, die zwischen Mikrobioten im Darmlumen und den Immunzellen im Gewebe vermitteln [8].

### **1.5.3 Die Bedeutung von intestinalen Endothelzellen und Hyaluronsäure bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Endothelzellen nehmen eine zentrale Rolle bei entzündlichen Erkrankungen wie bei Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa ein. Außerdem besteht ein enger Zusammenhang zwischen Angiogenese und HA [90]. Im akuten Entzündungsgeschehen werden Endothelzellen über proinflammatorische bakterielle Bestandteile, Mediatoren und Zytokine wie IL-1 und TNF- $\alpha$  [91] aktiviert. Letztere sind ebenfalls mit CED assoziiert und können bei erhöhter Krankheitsaktivität vermehrt nachgewiesen werden [92, 93]. Die aktivierten Endothelzellen setzen vasodilatatorische Stoffe wie Histamin frei, um den Blutfluss zu verlangsamen. Außerdem werden für die Zelladhäsion notwendige Rezeptoren, wie z.B. *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) oder VCAM-1 freigelegt. So werden die Saltation, die Adhäsion und die Transmigration von Leukozyten aus dem Blut ermöglicht. Liegt eine endotheliale Dysfunktion vor, kann es zur ungesteuerten Einwanderung von Leukozyten und damit zu einer unregulierten Entzündungsreaktion kommen, wie sie bei Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa vorliegt [94].

An HIMECs von Patienten mit CED konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Zellen aus entzündeten Darmabschnitten, verglichen mit Zellen aus nicht entzündeten Abschnitten, eine stärker ausgeprägte Leukozyten Adhäsion aufweisen [93, 95]. Dies scheint ein erworbener Effekt zu sein, da sowohl die Zellen mit höherer Adhäsionsrate als auch die mit niedrigerer von den gleichen Patienten stammten [95]. Diese Funktion bleibt den Endothelzellen auch nach Abklingen der Entzündung erhalten [96]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die für die Adhäsion notwendigen Moleküle ICAM-1 und VCAM-1 bei CED im Mausmodell vermehrt vorkommen [97]. Eine Blockade von VCAM-1 durch Antikörper oder eine Behandlung der HIMECs mit HYAL führt zu einer verminderten Leukozytenadhäsion bzw. einer Lösung der bereits erfolgten Adhäsion.

Zusammengenommen haben beide Behandlungen sogar einen additiven Effekt und können bis zu 87 % der Leukozytenadhäsion am Endothel wieder lösen [32]. Die Adhäsion der Leukozyten über VCAM-1 wird bereits therapeutisch durch entsprechende Antikörper wie Vedolizumab gehemmt und kommt bei Patient/-innen mit CED zum Einsatz [6].

*In vitro* konnte an Endothelzellen der kleinen Gefäße, die mit IL-1, TNF- $\alpha$  und bakteriellem Lipopolysaccharid über die Interaktion des Leukozyten Rezeptors CD44 stimuliert wurden, die Bildung von HA gefördert werden. Interessanterweise konnte dies nur für Endothelzellen der kleinen Gefäße gezeigt werden [91]. DeGrendele *et al.* konnten unter physiologischem Fluss zeigen, dass die Interaktion von löslicher und gebundener HA und dem CD-44-Rezeptor der Leukozyten zu einer vermehrten Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand führt [67].

Des Weiteren konnten Kessler *et al.* in einem Mausmodell mit durch DSS-induzierter Kolitis die Interaktion von endothelialer HA und Leukozyten des Blutes zeigen. In der histologischen Untersuchung zeigten sich kabelähnliche HA-Stränge im Lumen von kleinen intestinalen Blutgefäßen in direktem Kontakt mit Leukozyten [32]. Zudem konnten sie nachweisen, dass die Bildung von HA im Lumen dieser Gefäße sowie die Umorganisation von HA in Mukosa und Submukosa zeitlich vor der Einwanderung von Leukozyten und weiteren entzündungstypischen Gewebeveränderungen stattfand [32]. Im gleichen Ansatz untersuchten sie darüber hinaus die Auswirkung einer *in vitro* Stimulation durch TNF- $\alpha$  auf die *HAS* in HIMECs. Dabei konnten sie feststellen, dass lediglich die mRNA der *HAS3* vermehrt vorkam [78]. Dies legt nahe, dass die *HAS3* in den Endothelzellen des Darms unter proinflammatorischen Bedingungen von besonderer Bedeutung ist.

Außerdem konnten bei CED schon zu Beginn der Entzündung eine Veränderung der mikrovaskulären Struktur und Zusammensetzung beobachtet werden [9]. Im Stadium einer akuten Entzündung besteht sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa eine vermehrte Durchblutung der Mukosa und Submukosa [31, 98]. Die vermehrte Angiogenese kann über verschiedene Wege ausgelöst werden. In entzündeten Geweben herrscht häufig eine Minderversorgung mit Sauerstoff, diese

fördert über Faktoren wie *vascular endothelial growth factor*, *fibroblast growth factor-1*, *hypoxia-inducible factor-1* und TNF- $\alpha$  das Einsprossen von Gefäßen [94]. Daneben können auch Leukozyten proangiogenetische Faktoren freisetzen [9]. Auch HA, vor allem niedermolekulare HA, die über den CD44-Rezeptor und RHAMM mit den Endothelzellen interagiert [91, 99], ist dazu in der Lage die Angiogenese zu fördern [74, 75, 99]. Durch eine vermehrte Angiogenese können auch mehr Immunzellen ins Gewebe einwandern und so die Entzündungsreaktion verstärken [9]. Da dieser Mechanismus bei sämtlichen entzündlichen Erkrankungen von Bedeutung ist, sind bereits mehrere Antikörper zugelassen, die die Angiogenese oder die Leukozytenadhäsion am Endothel und somit die Auswanderung ins Gewebe unterbinden sollen. Hierzu gehört die Gruppe der anti-Integrin-Antikörper, wie z.B. Vedolizumab. Dieser Antikörper gegen das  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin wird bereits erfolgreich in der Therapie von CED eingesetzt [100]. Darüber hinaus konnte für CED gezeigt werden, dass es in entzündeten Arealen des Darms vermehrt zu erhöhten vaskulären Widerständen, granulomatösen Veränderungen und Mikrothromben kommt. Diese können zu Ischämien in der Darmmukosa führen, welche im Verlauf ulzerieren können [101-103]. Als Folge davon finden sich im Rahmen von chronischen Entzündungen fibrotisch umgebaute Areale mit verminderter Durchblutung [98, 101]. Es gibt demnach einen engen Zusammenhang von intestinalen Endothelzellen, *HAS3*, HA und der Leukozytenadhäsion bei CED.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation des Zelltyps, welcher maßgeblich für die proinflammatorischen Wirkungen der *HAS3* verantwortlich zu machen ist. Dies sollte mit Hilfe von Mäusen mit zelltypspezifischer Deletion der *Has3*, in welchen mittels DSS eine Kolitis induziert wurde, untersucht werden. Die zelltypspezifische *Has3*-Deletion umfasste

1. glatte Muskelzellen
2. Epithelzellen
3. Endothelzellen

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Lösungen, Substanzen und Farbstoffe für die Gewebepräparation, Histochemie und die Behandlung der Tiere

**Tabelle 1 Lösungen und Substanzen für die Gewebepräparation und Histochemie**

Die Tabelle zeigt die Materialliste aller verwendeten Lösungen und Substanzen, die für die Gewebepräparation und die Histochemie verwendet wurden.

<b>Lösung, Substanz</b>	<b>Herstellerinformationen</b>	<b>Gebrauchshinweis</b>
Blockierlösung	Siehe einzelne Bestandteile	Zusammensetzung: 10% TBS, 10% FBS, 1% BSA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	gebrauchsfertig
Citratpuffer (10%)	ZytomedSystems, Berlin	für Gebrauch 1:10 mit H <sub>2</sub> O dest. verdünnen
Essigsäure	Apotheke der Uniklinik, Düsseldorf	gebrauchsfertig
Ethanol (70%, 95%, 99%)	Apotheke der Uniklinik, Düsseldorf	gebrauchsfertig
Fetales Bovines Serum (FBS)	In vitrogen GmbH, Karlsruhe	gebrauchsfertig
Paraffin	Apotheke Uniklinik Düsseldorf	Gebrauch je nach Anwendung
Paraformaldehyd (4%)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	gebrauchsfertig
Peroxidasenblock (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30%)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	für Gebrauch 1:10 mit PBS (1mol) verdünnen
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, 20mol, 20x)	Siehe Bestandteile	Zusammensetzung: 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 mM NaCl 8,3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 zum Gebrauch 1:20 mit H <sub>2</sub> O dest. verdünnen
Roticlear® (Xylol)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	gebrauchsfertig
Rotimount® zum Eindecken	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	gebrauchsfertig

Salzsäure (HCl, 10 %)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	für Gebrauch 1:10 verdünnen mit H <sub>2</sub> O dest.
Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	siehe einzelne Bestandteile	100 mM Tris/HCl 1,5 mM NaCl pH 7,4
Trispuffer	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	Trispuffer, 0,5 molar, pH 7,6 (mit HCl einstellen) für Gebrauch 1:10 mit H <sub>2</sub> O dest. verdünnen

### Tabelle 2 Farbstoffe

Aufgeführt sind die für die Histochemie und Immunhistochemie verwendeten Farbstoffe und chromogenen Substrate.

Farbstoff, chromogenes Substrat	Herstellerinformation
Diaminobenzidin (DAB)	ZytomedSystems, Berlin
Eosin Y disodium salt (1% Lösung)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH in Steinheim
Hämalaun- Lösung (nach Mayer)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

### Tabelle 3 Arzneimittel und Substanzen für Behandlung der Tiere

In dieser Tabelle sind die für die Induktion des *Has3-Knockouts* und der Kolitis benötigten Substanzen, bzw. Arzneimittel aufgeführt.

Arzneimittel, Substanz	Herstellerinformation
Dextrannatriumsulfat ( <i>dextran sodium sulfate</i> , DSS)	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwede
Tamoxifen	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

## 2.1.2 Primärantikörper

### Tabelle 4 Primärantikörper

Die Tabelle enthält Angaben zu den Herstellern und Verdünnungen der verwendeten Primärantikörpern.

Antikörper	Herstellerinformation	Verdünnung
Anti-Mouse/Human Mac-2 (Galectin-3), Purified (Clone M3/38) (rat IgG2a) (#CL8942AP)	Cedarlane, Burlington (USA)	1: 600
Anti-CD45 antibody, rabbit- anti-mouse antibody (#ab10558)	Abcam, Cambridge (UK)	1: 100

### 2.1.3 Sekundärantikörper

**Tabelle 5 Sekundärantikörper**

Die Tabelle enthält Angaben zu den Herstellern und Verdünnungen der verwendeten Sekundärantikörpern.

<b>Antikörper</b>	<b>Herstellerinformation</b>	<b>Verdünnung</b>
Goat-anti-rat IgG2a HRP (NB7126)	Novus Biologicals, Wiesbaden Nordenstadt	1: 300
Goat-anti-rabbit IgG HRP (sc-2004)	Santa Cruz Biologicals, Heidelberg	1: 200

### 2.1.4 Geräte

**Tabelle 6 Geräteliste**

Die Tabelle enthält Angaben zu den verwendeten Geräten sowie deren Hersteller.

<b>Geräteart</b>	<b>Herstellerinformation</b>
Blutanalyse	Vet ABC, Scil Animal Care Company GmbH, Viernheim
Dampfgarer	Morphy Richards 48780, Teknihall Elektronik GmbH, Münster
Gewebeentwässerungsautomat	Tissue- Tek VIP E300, Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim
Kamera	Axio Cam HRC, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Kühlplatte	Leica EG 1150C, Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Mikroskop	Leica IMAGER M2, Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Paraffinausgießstation	Leica EG 1150H, Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Rotationsmikrotom	Leica RM 2255 und 3135, Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Trockenschrank	Heraeus Typ B 5050, Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vortex	Welabo, press-to-mix 34524, Snijders Labs, Tilburg (Niederlande)
Waage	Minimalwaage, EMB 500-1. Kern&Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad	MEDAX, Typ 25909, Neumünster



## 2.1.5 Software

**Tabelle 7 Software**

Aufgelistet sind alle eingesetzten Programme mit Herstellerangaben.

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
Axio Vision 4.9.1.0	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen
Endnote x8.0.2	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software, San Diego (USA)
Image J 1.48	National Institutes of Health (USA)
Microsoft Office: Excell, Word	Microsoft Corporation, Redmond (USA)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tiere und Tierversuchsgenehmigung

Insgesamt gab es drei Versuchsgruppen, in denen jeweils die Mäuse mit zelltypspezifischem *Has3-KO* mit den jeweiligen Kontrollgruppen verglichen wurden. Es wurden nur männliche Mäuse verwendet. Bei den Tieren handelte es sich um Mäuse mit zelltypspezifischem *Has3-KO* in den Endothel-, Epithel- oder glatten Muskelzellen sowie deren Kontrolltiere. Für die Hauptversuche wurden zwei Kontrollgruppen (Wildtyp, *WT1*, *WT2*) verwendet, da diese sich in den Ergebnissen ähnelten, wurde für die weiterführenden Untersuchungen nur die Kontrollgruppe *WT2*, im Folgenden *WT* genannt, eingesetzt. Die genaueren Genotypen-Bezeichnungen sind in der nachfolgenden Tabelle 8 und im Kapitel „Methoden“ aufgeführt. Gezüchtet und gehalten wurden die Mäuse in der Tierversuchsanstalt Düsseldorf unter konstantem 12h/12h Tag/Nachtrhythmus mit dem Aktenzeichen Az. 87-51.04.2010.A142. Die Behandlung am lebenden Tier und die Organentnahme sowie die Präparation des Darms wurden ausgeführt von Yanina Ostendorf, Nina Pasch und Christina Kohlmorgen.

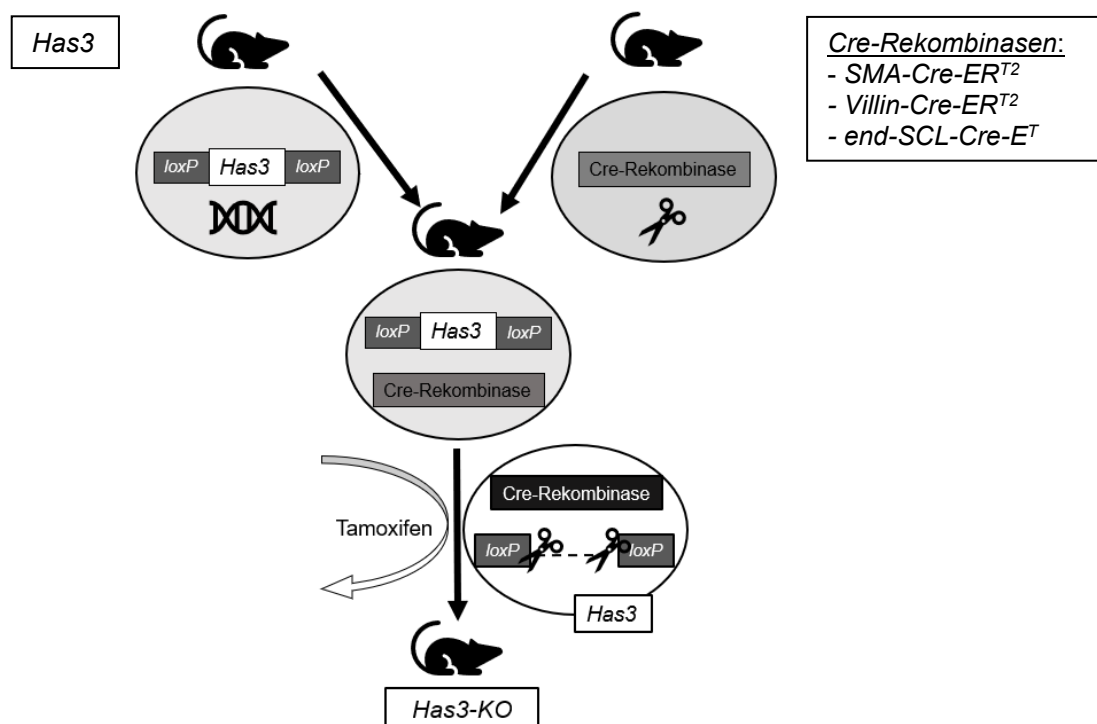
#### Tabelle 8 Auflistung aller Tiere

Es wurden Tiere eingesetzt mit *Has3-Knockout (KO)* in den glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells, SMC*), Epithelzellen (*Villin*) und in den Endothelzellen (*endothelial cells, EC*) sowie deren Kontrollgruppen (Wildtyp, *WT1*, *WT2* bzw. *WT*). Die Tiere sind aufgeführt mit Abkürzung, Genotyp und Alter bei Beginn der Behandlung mit Tamoxifen bzw. bei den *Villin Has3-KO* Tieren und deren Kontrollen stellt der Behandlungsbeginn die Kolitisinduktion mit Dextranatriumsulfat dar. Bei diesen Tieren war die Behandlung mit Tamoxifen und anschließender Auswaschphase nicht notwendig.

Maus	Genotypbezeichnung	Alter bei Behandlungsbeginn
<i>SMC Has3-KO</i>	<i>Has3</i> KI (fl/fl) <i>SMA-Cre-ER<sup>T2</sup></i> (+/-)	8-14 Wochen
<i>SMC Has3-WT 1</i>	<i>Has3</i> KI (fl/fl) <i>SMA-Cre-ER<sup>T2</sup></i> (-/-)	8-14 Wochen
<i>SMC Has3-WT/WT2</i>	<i>Has3</i> KI (-/-) <i>SMA-Cre-ER<sup>T2</sup></i> (+/-)	8-14 Wochen
<i>Villin Has3-KO</i>	<i>Has3</i> KI (fl/fl) <i>Villin-Cre-ER<sup>T2</sup></i> (+/-)	8-11 Wochen
<i>Villin Has3-WT 1</i>	<i>Has3</i> KI (fl/fl) <i>Villin-Cre-ER<sup>T2</sup></i> (-/-)	8-11 Wochen
<i>Villin Has3-WT/WT2</i>	<i>Has3</i> KI (-/-) <i>Villin-Cre-ER<sup>T2</sup></i> (+/-)	8-11 Wochen
<i>EC Has3-KO</i>	<i>Has3</i> KI (fl/fl) <i>end-SCL-Cre-E<sup>T</sup></i> (+/-)	14-18 Wochen
<i>EC Has3-WT 1</i>	<i>Has3</i> KI (fl/fl) <i>end-SCL-Cre-E<sup>T</sup></i> (-/-)	14-18 Wochen
<i>EC Has3-WT/WT2</i>	<i>Has3</i> KI (-/-) <i>end-SCL-Cre-E<sup>T</sup></i> (+/-)	14-18 Wochen

## 2.2.2 Generierung der verschiedenen Mauslinien

Untersucht wurden 8-18 Wochen alte männliche Mäuse mit einem *Has3*-KO in glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells, SMC*), Epithelzellen (*Villin*) und Endothelzellen (*endothelial cells, EC*) sowie deren Kontrollgruppen. Für die Untersuchung des Einflusses der *Has3*, wurde das *Cre*-System zur Induktion eines *Has3*-KO verwendet. Die *Has3* wurde zusätzlich mit *loxP* flankiert. *loxP* stellt für das Enzym *Cre*-*Rekombinase* eine spezifische Erkennungssequenz dar. Um einen zelltypspezifischen KO zu generieren wurden die geflochtenen Mäuse mit *end-SCL-Cre-ET* [104], *SMA-Cre-ER<sup>T2</sup>* [105] oder *Villin-Cre-ER<sup>T2</sup>* [106] Mäusen gekreuzt (Abb.5). Es wurden zunächst zwei Kontrollgruppen herangezogen: Mäuse mit humaner *Has3* ohne *Cre*-*Rekombinase* (*WT1*) und die entsprechenden zelltypspezifischen *Cre*-Mäuse ohne humane *Has3* (*WT2* bzw. *WT*). Dieses Modell wurde in Anlehnung an Spicer et al 1999 und das *Cre*-*Rekombinase*-Modell von Feil et. al 1996 durchgeführt [77, 107].



**Abb. 5 Generierung des zelltypspezifischen Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3**

Zur Generierung der *Knockout* (KO)-Mauslinien wurden zunächst Mäuse mit humaner Hyaluronsäuresynthase 3 (*Has3*) mit Mäusen gekreuzt, die eine spezifische *Cre*-*Rekombinase* im Genom enthalten. Die Aktivierung und Translokation der *Cre*-*Rekombinase* in den Zellkern erfolgte dann durch die Gabe von Tamoxifen. Die *Cre*-*Rekombinase* erkennt dort die mit *loxP* flankierte *Has3*-Sequenz, entfernt diese aus dem Genom und induziert so den KO.

### **2.2.2.1 Gefäßendothelspezifisch exprimierende Cre-Maus (*end-SCL-Cre-ER<sup>T</sup>*)**

Für die Generierung der endothelzellspezifischen *Has3-KO* Maus (*end-SCL-Has3 KO*) wurden (*end*)-*SCL-Cre-ER<sup>T</sup>*-Mäuse eingesetzt, welche freundlicherweise von Herrn Professor Dr. J. Göthert (Klinik für Hämatologie, Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt wurden [108]. Bei dieser Cre-Maus handelte es sich um eine Maus in deren Genom eine Fusion des *Cre-Rekombinase-Gens* mit einem gefäßendothelspezifischen durch Tamoxifen induzierbaren Estrogen-Rezeptor/Promotor eingebracht wurde. Das Enzym *Cre-Rekombinase* wurde somit ausschließlich gefäßendothelspezifisch im Zytoplasma exprimiert. Im Zeitraum von fünf Tagen wurden jeder Maus 5mg/d Tamoxifen per oral mit einer Schlundsonde verabreicht. Induziert durch die Bindung von Tamoxifen an das Fusionsprotein aus dem Estrogen-Rezeptor und der Cre-Rekombinase, erfolgte die Translokation des Enzyms in den Zellkern und dort die Exzision des geflochtenen *Has3-Gens* (mit *loxP* flankierte Sequenz), wodurch der endothelzelltypspezifische *Has3-KO* (*EC Has3-KO*) induziert wurde [108].

### **2.2.2.2 Glattmuskulär-spezifisch exprimierte Cre Maus (*SMA-Cre-ER<sup>T2</sup>*)**

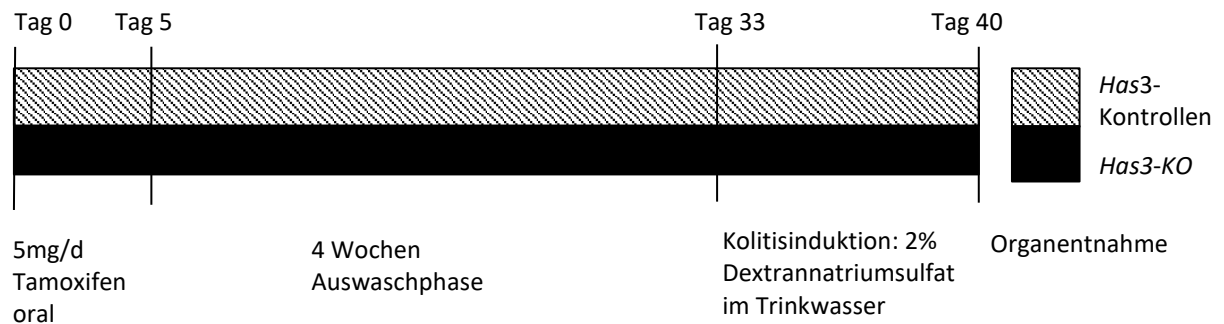
Die Maus mit spezifischen *Has3*-Defizit in den glatten Muskelzellen (*Has3 ki SMA-Cre-ER<sup>T2</sup>*) wurde mithilfe von *SMA-Cre-ER<sup>T2</sup>*-Mäusen generiert, die wir freundlicherweise von Pierre Chambon (Institute of Advanced Study of the University of Strasbourg, 5 allée du Général Rouvillois) erhielten. Bei den Mäusen mit zelltypspezifischem *Has3-KO* in den glatten Muskelzellen handelte es sich ebenfalls um ein Modell, das auf einer durch Tamoxifen aktivierten Translokation der *Cre-Rekombinase* basiert. Die Expression dieser wird durch den SM22 $\alpha$  Promotor in den glatten Muskelzellen reguliert. Anhand der Exzision des geflochtenen *Has3-Gens* (mit *loxP* flankierte Sequenz) wird der glattmuskulär-spezifische *Has3-KO* (*SMC Has3-KO*) induziert [104, 105].

### **2.2.2.3 Epithelzellspezifisch exprimierte Cre Maus (*Villin-Cre-ER<sup>T2</sup>*)**

Die Maus mit spezifischem epithelialem *Has3*-Defizit (*Has3 ki Villin-Cre-ER<sup>T2</sup>*) wurde mithilfe von *Villin-Cre-ER<sup>T2</sup>*-Mäusen generiert, die freundlicherweise von Prof. Dr. Scheller und Prof. Dr. Klein (Uniklinik Düsseldorf, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Genetik) zur Verfügung gestellt wurde. Im Gegensatz zu den beiden anderen Versuchsgruppen

muss die Translokation der *Cre-Rekombinase* der epithelzellspezifischen Mäuse nicht über Tamoxifen aktiviert werden. Die *Cre-Rekombinase* wird durch den Promoter Villin 1 reguliert und ist konstitutiv-aktiv. Durch Erkennung und Entfernung der mit *loxP* flankierten Sequenz wird der epithelzellspezifische *Has3-KO* (*Villin Has3-KO*) induziert [106].

### 2.2.3 Induktion der Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3 und der Kolitis



#### Abb. 6 Induktion der Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3 und der Kolitis

Die Abbildung zeigt des Behandlungsschema der Mäuse mit Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3 (*Has3*) und ihrer jeweiligen Kontrollen im zeitlichen Verlauf

Den Mäusen mit Deletion der *Has3* in den glatten Muskelzellen und Endothelzellen sowie deren Kontrollen wurde zunächst über fünf Tage 5mg/d Tamoxifen oral verabreicht. Das Tamoxifen induziert über die Aktivierung und Translokation der *Cre-Rekombinase* die zelltypspezifische Deletion. Bei den Tieren mit Deletion der *Has3* in den Epithelzellen und deren Kontrollgruppe ist dieser Schritt nicht erforderlich (siehe oben). Diese konnten daher bereits in jüngerem Alter eingeschlossen werden. Nach vier Wochen Auswaschphase bekamen alle Mäuse über sechs Tage Dextranatriumsulfat (*dextran sodium sulfate*, DSS, 2% im Trinkwasser) zugeführt. Durch dieses etablierte *in vivo* Modell wurde bei allen Mäusen eine akute Kolitis induziert. Der zeitliche Ablauf der Induktion des *KO* und der Kolitis sind in Abb. 6 dargestellt.

### 2.2.4 Organentnahme und Blutabnahme

Die Organentnahme erfolgte nach dem sechsten Tag der Kolitisinduktion. Die Mäuse wurden hierfür gewogen und anschließend getötet. Die Blutabnahme erfolgte mittels Herzpunktion in ein mit 10µl EDTA gefülltes 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß und die Blutanalyse erfolgte am Vet ABC.

Des Weiteren wurde das Kolon inklusive des Appendix entnommen und in eine Petrischale mit einmolarer PBS-Lösung gelegt. Nach Entfernung des Appendix wurde der Darm mit einmolarer PBS-Lösung gespült. Hierzu wurde ein passend zugeschnittener Butterfly®-Schlauch mit einer 10ml Spitze verwendet. Anschließend konnten das Gewicht und die Länge des Darmabschnitts bestimmt werden. Nun wurde er auf eine mit Eis gefüllte Petrischale gelegt und der Länge nach aufgeschnitten. Eine Hälfte wurde für mögliche weiterführende Untersuchungen in einem 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß bei -80°C konserviert. Die andere Hälfte wurde von rektal nach oral der Länge nach eng aufgerollt, in eine Histosette in ein mit 4% Formaldehyd gefülltes Becherglas gegeben und bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wurde die Probe in der Histosette in ein Becherglas mit einmolarer PBS-Lösung überführt und ebenfalls bei 4 °C gelagert. Danach wurden die Proben mit dem Gewebeentwässerungsautomaten Tissue Tek VIP E300 aufbereitet. Nach der Entwässerung wurden die Proben mit Hilfe einer Paraffinausgießstation in Paraffinblöcke gegossen.

### **2.2.5 Schneiden und Hitzefixieren**

Anschließend wurden von den gekühlten Paraffinblöcke mit einem Rotationsmikrotom je 5µm dicke Schichten abgetragen. Sobald der distale Darmabschnitt, der sich im Zentrum der Darmschnecke befindet, vollständig abgebildet war, wurden die Proben auf Objektträger aufgenommen, wobei immer zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen wurden. Von jeder Probe wurden insgesamt 25 Objektträger angefertigt. Die Präparate wurden anschließend über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet, um am nächsten Tag bei 60°C für eine Stunde im Ofen hitzefixiert zu werden. Nach dem Erkalten wurden von jedem Präparat histochemische bzw. immunhistochemische Färbungen erstellt.

### **2.2.6 Färbungen**

#### **2.2.6.1 Hämalau und Eosin**

Die Hämalau- und Eosin-Färbung wurde nach einem in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliertem Protokoll an hitzefixierten Präparaten durchgeführt. Für die Färbung wurden die Objektträger mit den Paraffinschnitten in Glasküvetten gestellt. Diese

wurden dann mit denen im Folgenden beschriebenen Lösungen gefüllt. Zunächst wurden die Schnitte von dem Paraffinrest befreit. Hierfür wurden sie drei Mal für jeweils 15 Minuten in Roticlear®-Lösung eingelegt. Danach folgte eine jeweils zweiminütige Behandlung mit einer Alkoholreihe in absteigender Konzentration mit 99%iger, 96%iger und 70%iger Lösung. Anschließend wurden die Objektträger zwei Mal für fünf Minuten in einmolarer PBS-Lösung gewaschen.

Dann folgte die Kernfärbung mit jeweils einminütiger Einwirkzeit von zunächst destilliertem Wasser und dann Hämalaun. Danach wurden die Objektträger kurz mit Leitungswasser gewaschen und in 1%iger Salzsäure differenziert. Unter fließendem Wasser wurden die Schnitte dann fünf Minuten lang gebläut. Für eine weitere Minute wurde eine Eosin-Lösung hinzugegeben.

Zum Eindecken wurden die Objektträger mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%ige, 96%ige und 99%ige Lösung) für jeweils zwei Minuten behandelt, schließlich folgten noch fünf Minuten in Roticlear®-Lösung. Zum Schluss wurden die Objektträger aus der Glasküvette genommen, getrocknet und dann mit dem nicht wässrigen Eindeckmedium Rotimount® und einem Deckglas eingedeckt.

#### **2.2.6.2 Immunhistochemische Färbungen: Anti-Mac2 und Anti-CD45**

Die immunhistochemische Färbung für den *Anti-Mac2*-Antikörper wurde nach einem bereits etablierten Protokoll an hitzefixierten Präparaten durchgeführt. Die *Anti-CD45* Färbung wurde in Anlehnung an die *Anti-Mac2*-Färbung neu etabliert. Wie bei der Hämalaun- und Eosin-Färbung wurden die Objektträger mit den Paraffinschnitten in Glasküvetten gestellt und nach gleichem Schema entwässert (s.o.). Nach der Alkoholreihe folgten bei der *Anti-Mac2* Färbung drei Waschschriffe mit einmolarer PBS-Lösung für je fünf Minuten.

Bei der *Anti-CD45*-Färbung wurden die Präparate zwei Mal für je fünf Minuten in einmolarer PBS-Lösung gewaschen. Danach wurde zusätzlich ein *Antigen-Retrieval* durchgeführt. Hierfür wurden die Präparate für 35 Minuten in bereits erhitztem Citratpuffer im Dampfgerar gekocht. Nach Erkalten der Lösung wurden die Objektträger erneut für jeweils drei Mal fünf Minuten in einmolarer PBS-Lösung

gewaschen. Nach dem Waschen wurde bei beiden Färbungen wieder mit den gleichen Arbeitsschritten verfahren.

Als nächstes folgte die Inkubation mit einer Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Primärantikörper appliziert: *Anti-Mac2*, 1:600 verdünnt mit 1%iger BSA/PBS-Lösung und *Anti-CD45*, 1:100 verdünnt mit 1%iger BSA/PBS-Lösung. Es wurden jeweils 40µl auf die Positiv-Probe pipettiert und 40µl 1%iger BSA/PBS-Lösung auf die Negativ-Probe. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger wieder in Glasküvetten gestellt und drei Mal für fünf Minuten mit einmolarer PBS-Lösung gewaschen. Danach wurde der Peroxidaseblock durchgeführt mit 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS-Lösung mit fünfminütiger Einwirkzeit. Dann folgte ein erneuter Waschschrift mit drei maliger Applikation von einmolarer PBS-Lösung für je fünf Minuten. Anschließend konnte der Sekundärantikörper aufgetragen werden: bei der *Anti-Mac2*-Färbung wurde *Goat-anti-rat IgG2a HRP* appliziert, welcher 1:300 mit einmolarer PBS-Lösung verdünnt wurde und bei der *Anti-CD45*-Färbung wurde der *Goat-anti-rabbit IgG HRP* in einer Verdünnung von 1:600 verwendet. Es wurden hierbei sowohl auf die Positiv- als auch auf die Negativ-Probe circa 40µl Lösung aufgetragen und über eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer gelagert. Danach folgte ein erneuter Waschschrift mit einmolarer PBS-Lösung drei Mal für fünf Minuten.

Zur Detektion mit Diaminobenzidin (DAB) folgte zunächst eine zehnminütige Einwirkzeit mit einmolarem Trispuffer. Danach wurden die Objektträger bei der *Anti-Mac2*-Färbung für 30 Sekunden und bei der *Anti-CD45*-Färbung für 2 Minuten in die DAB-Lösung getaucht. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die Proben nun erneut mit Trispuffer für fünf Minuten und dann mit destilliertem Wasser für eine Minute gewaschen. Die anschließende Kernfärbung und das Eindecken erfolgten wie bei der Hämalau- und Eosin-Färbung (s.o.).



## 2.3 Auswertung

### 2.3.1 Gewichtsverlauf

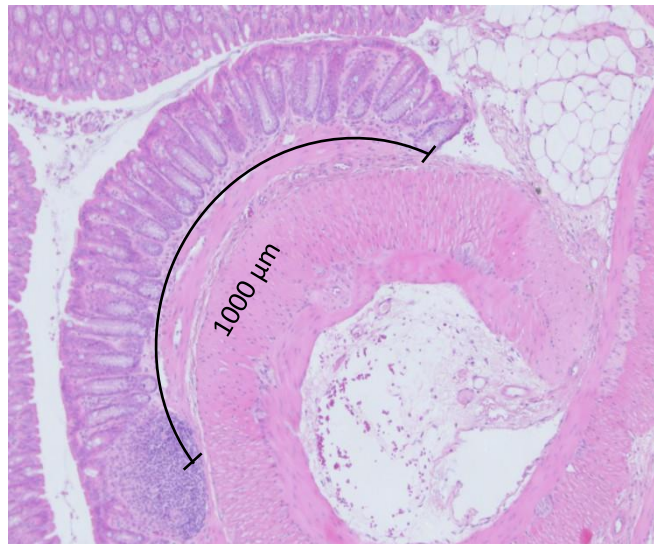
Die Mäuse wurden an jedem Tag der DSS-Behandlung gewogen. Das Gewicht absolut aufgezeichnet sowie prozentual, wobei das Gewicht zu Beginn der Behandlung für jede Gruppe mit 100% gleichgesetzt wurde und die Gewichte der folgenden Tage darauf bezogen wurden. Der Gewichtsverlauf der Mäuse mit zelltypspezifischen *Has3*-KO und ihrer jeweiligen Kontrollen wurden anschließend verglichen.

### 2.3.2 Beurteilung von Darmgewicht und -länge

Bei Organentnahme wurde sowohl das Gewicht des gespülten Darmabschnitts ohne Appendix als auch dessen Länge bestimmt und zudem in ein Verhältnis zu einander gesetzt. Umso schwerer und kürzer der Darmabschnitt war, umso größer wurde dabei der Quotient. Ein höherer Wert sollte somit mit einer stärker ausgeprägten Entzündung korrelieren. Anschließend wurden die Mäuse mit zelltypspezifischen *Has3*-KO mit ihren jeweiligen Kontrollen verglichen.

### 2.3.3 Kolitis-Score

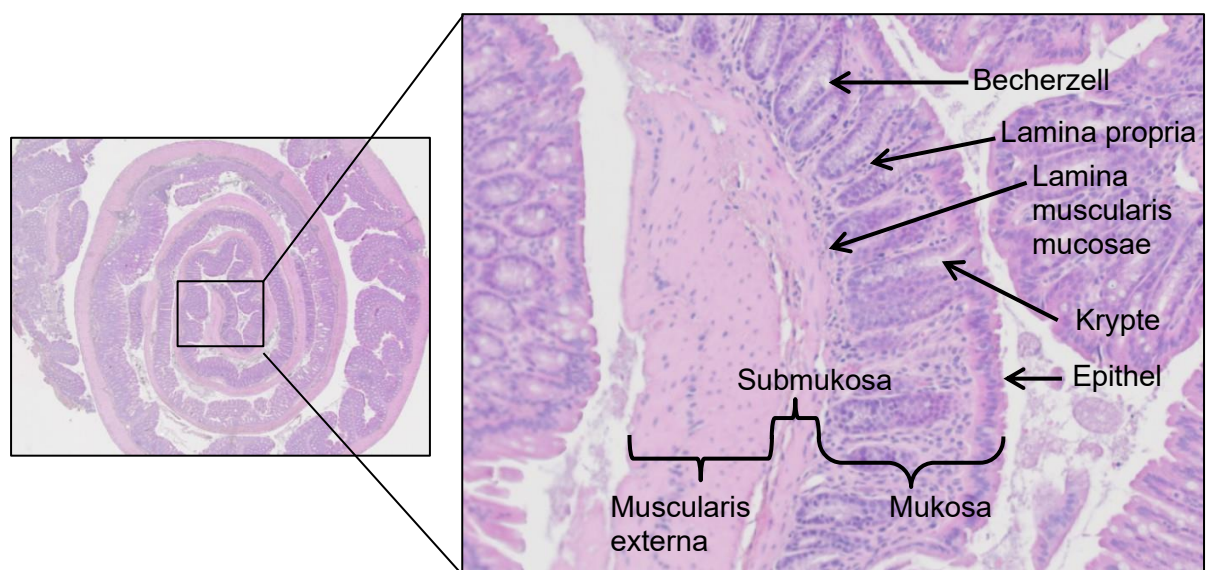
Um das Ausmaß der Entzündung im Darm beurteilen zu können, wurde für jedes Präparat ein Punktesystem, der sog. *Kolitis-Score* ermittelt. Zunächst wurden die zuvor mit Hämalaun und Eosin gefärbten Präparate in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen.



**Abb. 7 Auswertungsbereich**

Abbildung eines Darmlängsschnittes mit ausgemessenem Bewertungsbereich: 1000µm von rektal gemessen. Die Abbildung zeigt eine in Hämalaun und Eosin gefärbten Darmschnitt in 100-facher Vergrößerung

Als Übersichtsaufnahme diente die 25-fache Vergrößerung. Damit konnten die Veränderungen der Darmwand zunächst in der Übersicht betrachtet werden. Die meisten Parameter des Scores ließen sich am besten in den Vergrößerungen 50-fach und 100-fach beurteilen. Die 200-fache Vergrößerung wurde ebenfalls von allen Präparaten angefertigt und als Detailaufnahme verwendet. In der Detailaufnahme konnten schon leichte Veränderungen der Krypten gut erkannt werden. Als auszuwertender Bereich wurden die terminalen 1000µm der Darmschnecke ausgewählt (Abb. 7), was ein bereits etabliertes Vorgehen darstellt [24]. Im Zentrum der Darmschnecke befand sich das terminale Ende des Darms und wurde mit Axio Vision vor der Beurteilung vermessen. Das dargestellte Beispielbild (Abb. 8) soll die Festlegung des zu beurteilenden Bereiches verdeutlichen. Um das Bewertung zu objektivieren, führten drei Untersucher verblindet und unabhängig voneinander die Beurteilung aus. Diese Beurteilungskriterien wurden in unserer Arbeitsgruppe von Annette von Glinski [81] in Anlehnung an Lahat et. al. zusammengestellt [109] und sind in Tabelle 9 zusammengestellt.



**Abb. 8 Aufbau der Darmwand für die histologische Auswertung**

Übersichtsaufnahme in 25-facher Vergrößerung (linkes Bild) und eine Detailaufnahme in 200-facher Vergrößerung (rechtes Bild) mit Beschriftung der im *Kolitis-Score* beurteilten Strukturen. Beide Aufnahmen zeigen jeweils einen in Eosin und Hämalaun gefärbten Kolonlängsschnitt.

**Tabelle 9 Kolitis-Score**

Dargestellt sind die Parameter und Bewertung des *Kolitis-Score*; GDWA= gesamter Darmwandabschnitt, M= Mukosa, LP= Lamina propria, LMM= Lamina muscularis muscosae, SM= Submukosa, LM= Lamina muscularis, BGW= Bindegewebe, LF= Lymphfollikel

<b>Punkte</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>I. Kryptentiefe</b>	
0: normal	bis LMM
1: leicht abgenommen	auf 2/3 M (lokal, <10% GDWA)
2: stark abgenommen	auf 2/3 M (generalisiert, >10% GDWA) oder <1/3 der M
3: nicht beurteilbar	völliger Verlust der Kryptenstruktur
<b>II. Kriptenstruktur</b>	
0: normal	tubulär, scharf abgrenzbarer geschlossener Zellverband
1: vereinzelt entformt	<10% des GDWA
2: mäßig entformt	10-70 % des GDWA
3: stark entformt	>70% des GDWA
<b>III. Submukosa</b>	
0: normal	kompakt, sehr dünn, schwer abgrenzbar
1: verbreitert	BGW/Zellen vermehrt, aufgelockerte SM
2: abgesetzt	zusätzlich komplette Absetzung zur LM
<b>IV. Zelluntergang</b>	
0: physiologisch	kompaktes Gewebe, Zellzusammenhalt, Homogenität
1: gering gesteigert	Oberflächenepithel verstärkt abgelöst
2: stark apoptotisch	Krypten der M apoptotisch, unklare Abgrenzung des Zylinderepithels, faserig, löcherige Zelloberfläche
3: komplett zerstört	GDWA zerstört
<b>V. Inflammation</b>	
0: nicht gesteigert	LP schmal, unscharfe Abgrenzung zur LMM und Kriptenepithel
1: leicht	LP umgibt komplett basalen Anteile des Kriptenepithels
2: mäßig	Zunahme der Zellen der LP bis 10% der gesamten M oder 1 markanter Lokus
3: stark	Zellzunahme mit Verbreiterung der LP > 10% gesamte M
<b>Vla. Lymphfollikel</b>	
0: Nicht vorhanden	kein LF vorhanden
1: <2	<2 LF
2: >2	>2 LF
<b>Vlb. Becherzellen</b>	
0: 50%- 100%	Becherzellen füllen Krypten nahezu komplett aus
1: 10%- 50%	10% -50% Becherzellen vorhanden
2: <10%	<10% Becherzellen vorhanden

Die anhand der Parameter beurteilten Strukturen sind in der Abb. 8 dargestellt. Für die einzelnen Parameter (Tabelle 9) wurden Punkte vergeben. Diese wurden von jedem Untersucher für jede Darmschnecke addiert, so dass sich für jedes Präparat ein Gesamtwert ergab. Für jede Darmschnecke wurden dann die Ergebnisse aller drei Untersucher gemittelt. Vereinfacht dargestellt entspricht ein höherer Wert einer stärker ausgeprägten Kolitis.

#### **2.3.4 Area Fraction mittels ImageJ bei immunhistochemischen Färbungen**

Bei der *Area Fraction* der immunhistochemischen Färbungen wurden die positiv gefärbten Areale, die jeweils Makrophagen (*Anti-Mac2*) oder allgemein Leukozyten (*Anti-CD45*) kennzeichneten, auf die gesamte ausgewertete Fläche bezogen. Diese wurde auf die terminalen 1000µm des Darms und dort auf das basale Drittel der Mukosa begrenzt. Die Auswertung erfolgte mit der Software *Image J*. Hierbei wurden in den Bildern die grünen und blauen Farbspektren entfernt, da in diese z.B. die Kernfärbungen enthalten, die nicht untersucht werden sollten. Ausgewertet wurden folglich die Darstellungen mit rotem Farbspektrum, welche die gewünschten Areale verbildlichten. Daraufhin wurde an einem Referenzbild für die *Anti-CD45* und die *Anti-Mac2*-Färbungen jeweils spezifisch für jede Versuchsgruppe (zelltypspezifischer KO und die jeweilige Kontrollgruppe) der als positiv zu wertende Bereich im Spektrum festgelegt und dieser sogenannte *Threshold* über alle Bilder einer Versuchsgruppe angewendet.

#### **2.3.5 Statistik**

Die Statistiken wurden mit GraphPad Prism (Version 6.0.1) erstellt. Die Gewichtsverläufe wurden mittels *two-way ANOVA* und Sidak-Test verglichen. Zur Auswertung des Darmgewichts und der -länge sowie des dazugehörigen Quotienten, der Blutwerte sowie aller histologischen und immunhistologischen Färbungen wurden ungepaarte t-Tests verwendet. Zur Kontrolle der Varianzen wurde zudem ein F-Test verwendet. Bei positivem F-Test wurde nach Mann-Whitney ausgewertet, was bei den betroffenen Analysen entsprechend unterhalb der Graphen vermerkt wurde. Alle Fehlerbalken zeigen den Mittelwert und den Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM). Das jeweilige Signifikanzniveau ist unter jeder Abbildung angegeben und

bezieht sich auf ein 95% Konfidenzintervall. *Outlier* nach Grubbs' wurden ausgeschlossen.

### 3 Ergebnisse

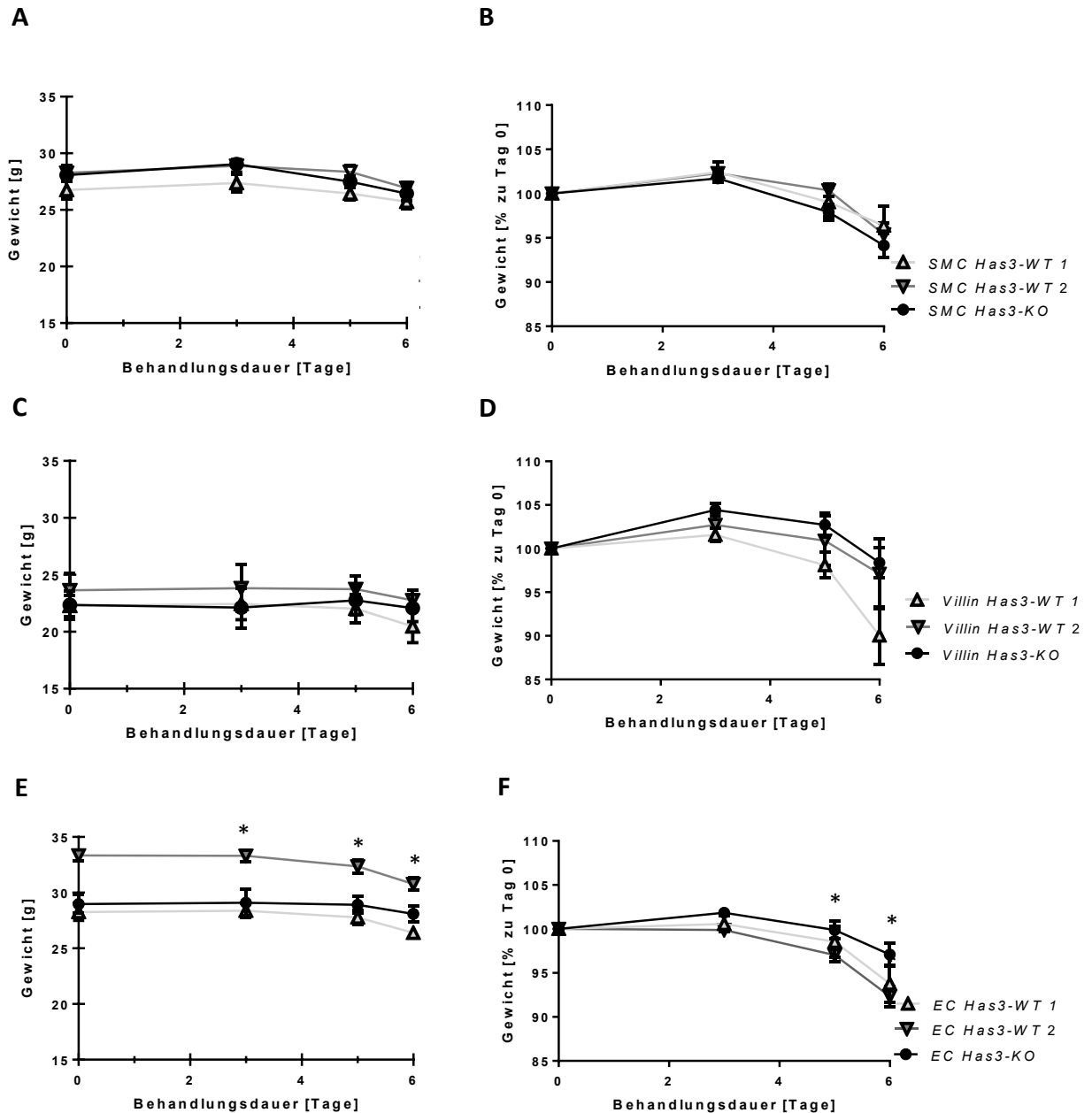
#### 3.1 Bewertung der Schwere der Kolitis

##### 3.1.1 Gewichtsverlauf unter Kolitis

Zur Einschätzung des Schweregrades der Kolitis wurden verschiedene Parameter bestimmt. Ein etablierter Faktor ist hierbei die Aufzeichnung des Gewichtsverlaufs, insbesondere die mit einer akuten Darmentzündung einhergehende Abnahme des Gewichts dient als Marker für den Schweregrad der Kolitis [110]. Darüber hinaus ermöglichte die Aufzeichnung des Gewichtsverlaufs auch eine Beurteilung der Gesundheit und des Wohlbefindens der Versuchstiere.

Die Gewichtsverläufe wurden für den Zeitraum vom Beginn der Kolitisinduktion mittels DSS bis hin zum Tag der Organentnahme aufgezeichnet (Tag 0-6). Verglichen wurden sowohl die absoluten wie auch die relativen Gewichtsänderungen der Mäuse der Versuchsgruppe mit ihren jeweiligen Kontrollgruppen *WT1* und *WT2*. Die relative Gewichtsänderung wurde als Quotient des Gewichts am jeweiligen Untersuchungstag zum Anfangsgewicht dargestellt (Abb. 9).

Zu Beginn der Behandlung mit DSS nahmen die meisten Tiere zunächst gering an Gewicht zu. Im Verlauf verloren die Tiere mit *SMC Has3-KO* tendenziell mehr Gewicht als ihre Kontrollgruppen. Dieser Unterschied war jedoch am Ende der Behandlung (Tag 6) nicht signifikant. Die Gewichtsabnahme betrug an Tag 6 bei den *SMC Has3-KO* 5,9% im Vergleich zum Ausgangswert, bei den *WT1* lag die Gewichtsabnahme bei 3,6% und bei den *WT2* bei 4,6% (A, B). In der Gruppe der *Villin Has3-KO* Tiere und ihren *WT1* sowie *WT2* gab es keinen signifikanten Unterschied im Gewichtsverlauf (C, D). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Tieren mit *EC Has3-KO* im Vergleich zu ihren *WT2* (D, E) ein signifikant geringerer Gewichtsverlust im Verlauf der Kolitis (*two-way ANOVA*  $p < 0,01$ ,  $p$  an d6  $< 0,05$ ). Konkret ergab sich an Tag 6 eine Gewichtsabnahme von circa 7,7 % im Vergleich zum Anfangsgewicht in der Gruppe der *WT2* und 2,7% in der Gruppe der *EC Has3-KO* Tiere. Dieses Ergebnis wurde tendenziell auch durch die Gruppe der *WT1* widerspiegelt, wobei sich hier letztlich keine Signifikanz ergab (relativer Gewichtsverlust *WT1*: 6,3% im Vergleich zu 2,7 % bei den *EC Has3-KO*;  $p=0,375$ ).

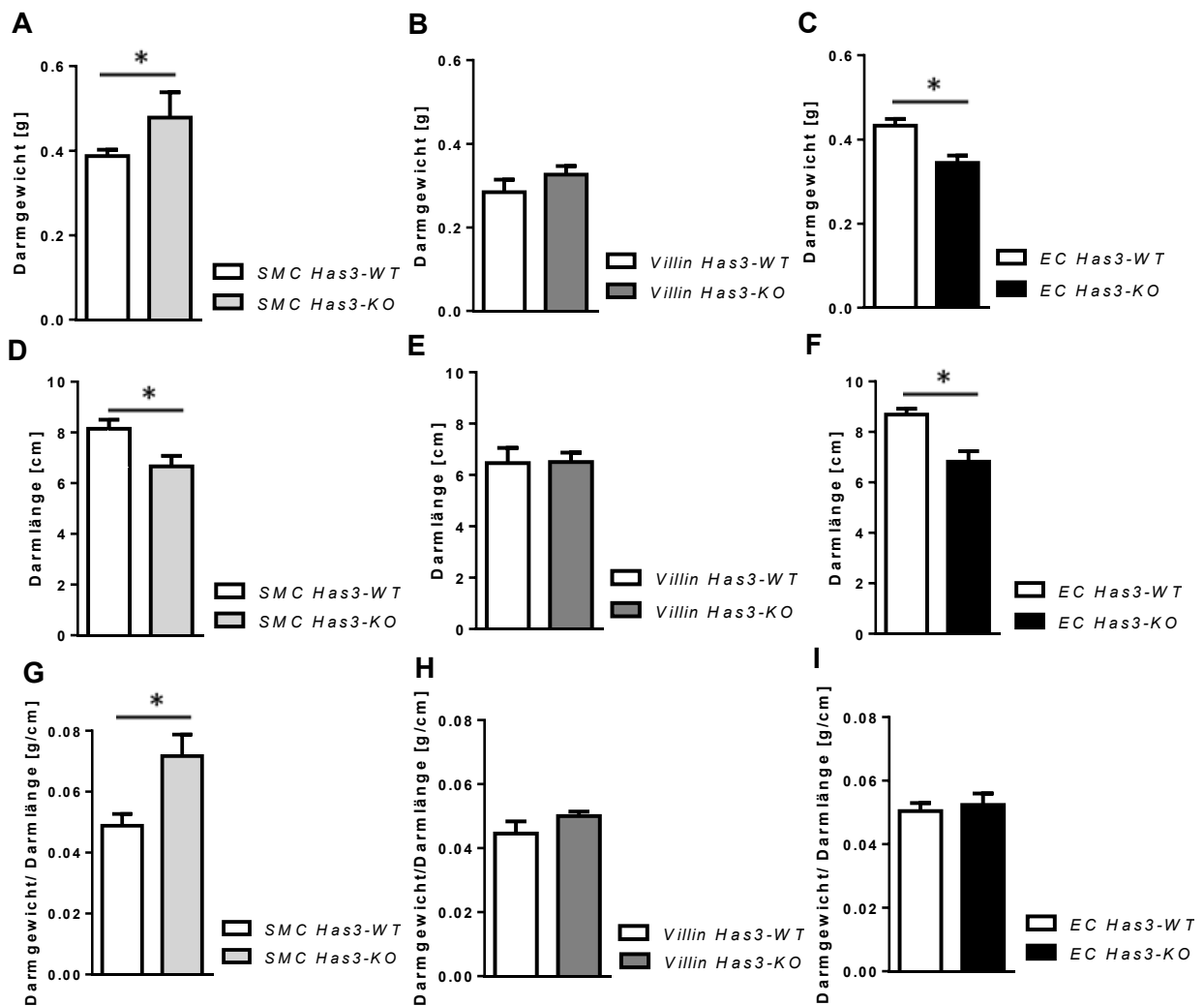


**Abb. 9 Signifikant geringere Gewichtsabnahme bei Mäusen mit endothelzellspezifischem Defizit der Hyaluronsäuresynthase 3**

Die Diagramme zeigen das Gewicht der Versuchstiere im Zeitverlauf während der Kolitisinduktion. Dargestellt ist das Gewicht der Versuchstiere absolut (linke Seite) und relativ zum Ausgangsgewicht an Tag 0 (rechte Seite). Verglichen werden die Mäuse mit Defizit (*Knockout, KO*) der Hyaluronsäuresynthase (*Has3*) in den glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells, SMC; A, B*), in den Epithelzellen (*Villin, C, D*) und in den Endothelzellen (*endothelial cells, EC, E, F*) mit ihren jeweiligen Kontrollgruppen (Wildtypen, *WT1* und *WT 2*). Die Auswertung erfolgte mit einem *two-way ANOVA* sowie Sidak-Test, Mittelwert +/- SEM; A: n= 8,11,9; B: n=11,5,11; C: n=11,10,12, *two-way ANOVA Interaction*, E:  $p= 0,0003$ , F:  $p= 0,0029$ , Sidak-Test \* $p<0,05$

### 3.1.2 Makroskopische Beurteilung von Darmgewicht und -länge

Bei einer akuten Kolitis kommt es durch ödematöse Aufschwemmung und narbige Verkürzungen zur Gewichtszunahme und Verkürzung des Darms. Zusammengefasst werden diese Prozesse in einem Quotienten aus Darmgewicht zu Darmlänge. Die Schwere der Entzündung korreliert somit mit dem Gewicht und der Verkürzung des Darms, dem entsprechend deutet ein erhöhter Quotient auf eine stärkere Entzündung hin. Als Kontrollgruppe wurde jeweils die Gruppe der *WT2*, hier *WT* genannt, verwendet (Abb.10).



**Abb. 10 Erhöhter Darmgewicht/-länge Quotient bei Defizit der Hyaluronsäuresynthase 3 in den glatten Muskelzellen**

Dargestellt sind das Gewicht und Länge sowie der Darmgewicht/-länge Quotient der Dickdärme der verschiedenen Versuchsgruppen mit *Knockout (KO)* der Hyaluronsäuresynthase (*Has3*) in den glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells, SMC*; **A, D, G**), Epithelzellen (*Villin*; **B, E, H**) und in den Endothelzellen (*endothelial cells, EC*; **C, F, I**) im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen (Wildtypen, *WT*). *WT* entspricht hierbei der Kontrollgruppe *WT2*. Ein erhöhter Darmgewicht/-länge Quotient deutet auf eine stärker ausgeprägte Entzündung hin. Die Auswertung wurde durchgeführt mit einem ungepaarten t-Test, Mittelwert +/- SEM; A, D, G: n=10,9; B, E, H: n= 5,11; C, F, I: n= 10,12; \**p*<0,01

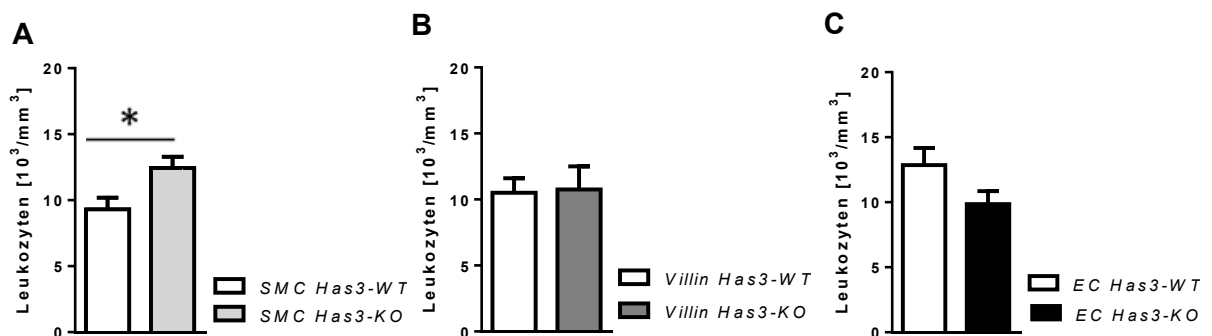


Hierbei fiel auf, dass die Gruppe der *SMC Has3-KO* Tiere (A, D, G) sowohl einen signifikant erhöhten Wert für das Darmgewicht und die Darmlänge als auch für den Quotienten von Darmgewicht zu Darmlänge aufwiesen ( $p=0,0011$ ). In der Versuchsgruppe mit *SMC Has3-KO* betrug der Quotient 0,072 g/cm und war somit um ca. 47% höher als in der Gruppe der *WT* (Quotient: 0,049 g/cm). Bei den Tieren mit *Villin Has3-KO* (B, E, H) und *EC Has3-KO* (C, F, I) konnte kein signifikanter Unterschied gesehen werden.

## 3.2 Inflammation

### 3.2.1 Zirkulierende Leukozyten

Bei akuten oder chronischen Entzündungen kommt es in der Regel zum Anstieg zirkulierender Leukozyten als Zeichen der Immunreaktion, so dass eine erhöhte Leukozytenzahl einen Rückschluss auf die Ausprägung der Entzündung zulässt. Den Mäusen mit zelltypspezifischer *Has3*-Deletion und ihren Kontrollen wurden daher am letzten Tag der Kolitisinduktion Blut abgenommen und die Anzahl an Leukozyten untersucht (Abb.11). Ausgewertet wurde die *KO*-Gruppe im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrolle *WT2*, hier *WT* genannt. Hierbei fiel auf, dass sich signifikant ( $p=0,0327$ ) mehr Leukozyten im Blut von Mäusen mit *Has3*-Deletion in den glatten Muskelzellen (A) befanden. Hingegen gab es in der Gruppe der *Villin Has3-KO* Tiere (B) und ihrer Kontrolle keine relevanten Unterschiede in der Leukozytenzahl. Ein Trend zu geringerer Leukozytenzahl ( $p=0,1080$ ) konnte bei den Tieren mit *EC Has3-KO* (C) gesehen werden.



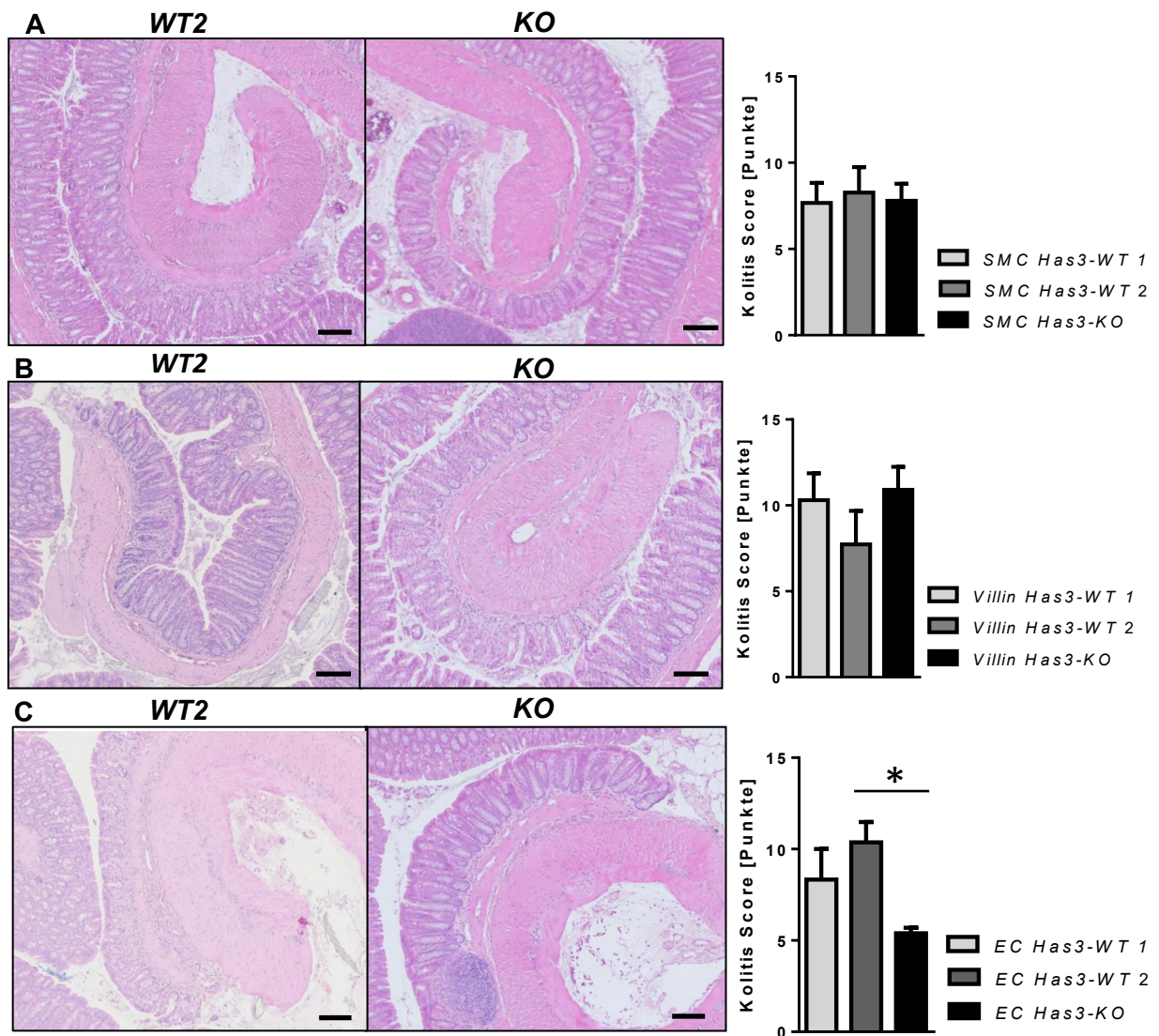
**Abb. 11 Trend zu geringeren Leukozytenzahl bei den Mäusen mit zelltypspezifischem Defizit der Hyaluronsäuresynthase 3 in den Endothelzellen**

Gezeigt ist die Anzahl der zirkulierenden Leukozyten der Mäuse mit *Knockout* (KO) der Hyaluronsäuresynthase (*Has3*) in den glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC; A), in den Epithelzellen (*Villin*; B) und in den Endothelzellen (*endothelial cells*, EC; C) jeweils gegenüber den Kontrollen (Wildtypen, WT). WT entspricht hierbei der Kontrollgruppe WT2. Abgenommen wurde das Blut am letzten Tag der Kolitisinduktion. Die Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test, Mittelwert  $\pm$  SEM, A: n= 10,6; B: n= 3, 5; C: n= 4, 5, \* $p<0,05$

### 3.2.2 Gewebeständige Inflammation

#### 3.2.2.1 Histologische Auswertung der Schwere der Kolitis

Zur weiteren Beurteilung des Schweregrades der Entzündung wurde das Dickdarmgewebe histologisch untersucht. Hierfür wurden zunächst Färbungen in Hämalaun und Eosin gefertigt, welche anhand zuvor festgelegter Parameter in Form eines Punktesystems, dem sog. *Kolitis-Score* bewertet wurden (s. „Material und Methoden“).



**Abb. 12 Niedrigerer Kolitis-Score bei endothelzelltypischer Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3**  
Die Längsschnitte des Kolons wurden mit Hämalaun und Eosin gefärbt und nach festgelegten Kriterien der *Kolitis-Score* bestimmt. Abgebildet sind die Bilder repräsentativer Kolonlängsschnitte in 100-facher Vergrößerung mit einem Balkendiagramm zur Darstellung des jeweiligen *Kolitis-Score*. Das Diagramm zeigt den Vergleich von Mäusen mit *Knockout* (KO) der Hyaluronsäuresynthase (*Has3*) in den glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC; **A**), in den Epithelzellen (*Villin*; **B**) und in den Endothelzellen (*endothelial cells*, EC; **C**) und den jeweiligen Kontrollgruppen (Wildtypen, WT1 und WT2). Der Maßstab entspricht 100µm. Die Auswertung erfolgte mit ungepaartem t-Test und zeigen Mittelwert +/- SEM; A: n=8,11,9; B: n= 11,5,11; C: n= 10,10,12 \* $p < 0,01$

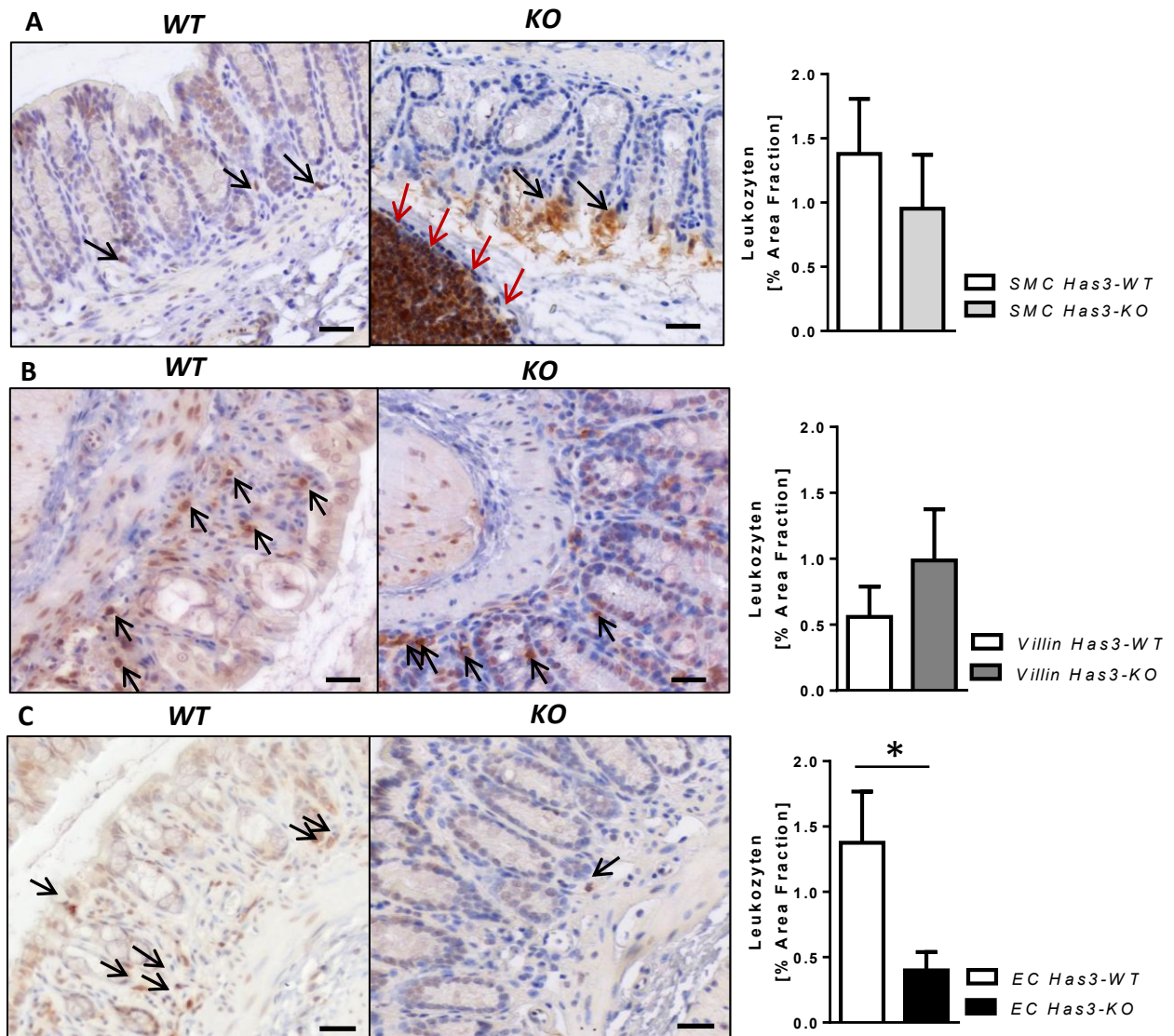
Bewertet wurden die letzten 1000µm der in Hämalaun und Eosin gefärbten Darmschnecken. Zur Bewertung wurden Kriterien, wie z.B. die Kryptentiefe und Breite der Lamina propria, herangezogen. Eine höhere Punktzahl entsprach dabei einer stärkeren Entzündungsreaktion, repräsentative Beispielbilder der histologisch aufbereiteten Darmabschnitte der *KO*-Tiere sowie der *WT2* mit der entsprechenden Auswertung des Kolitis Scores sind in der Abb. 12 dargestellt. Der Punktwert wurde von drei Untersuchern verblindet erhoben. Die Auswertung des *Kolitis-Scores* (Abb. 12) ergab für die Tiere mit *SMC Has3-KO* (A) und *Villin Has3-KO* (B) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu ihren *WT1* und *WT2*. Die Tiere erreichten in diesen Gruppe zwischen 7 und 10 Punkten. Dahingegen wiesen die Tieren mit *EC Has3-KO* (C) eine signifikant ( $p < 0,0003$ ) geringere Entzündungsreaktion auf: während die *EC Has3-KO* Tiere im Mittel 5 Punkte erreichten, erhielt die Gruppe der *WT2* im Mittel 10 Punkte. Im Vergleich zu ihren *WT1* konnte ein Trend zu geringer ausgeprägten Entzündung in der *KO*-Gruppe gesehen werden ( $p = 0,071$ ). Hier wurden die Tiere im Mittel mit 8 Punkten bewertet.

### 3.2.2.2 Gewebeständige Leukozyten

Um die Entzündungsreaktion im Darmgewebe spezifischer untersuchen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt und die Anzahl und Verteilung der eingewanderten Immunzellen analysiert. Zunächst erfolgte eine Darstellung mittels des Pan-Leukozytenmarkers *CD45* (Abb. 13). In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Makrophageninvasion (*Anti-Mac2-Färbung*, Abb. 14), welche insbesondere in der akuten Phase der Kolitis eine Rolle spielt, verdeutlicht. Ausgewertet wurde der positiv gefärbte Bereich im Verhältnis zum restlichen Gewebe der Mukosa, die sogenannte *Area fraction*. Als Bewertungsbereich dienten auch hier die letzten 1000µm der Darmschnecken. Da sich in der Analyse der Makrophagenverteilung mittels *Anti-Mac2-Färbung* beide Kontrollgruppen *WT1* und *WT2* vergleichbar verhielten (Abb. 14) wurde für die Untersuchung mittels des Pan-Leukozytenmarkers *CD45* lediglich die Kontrolle *WT2*, im Folgenden *WT* genannt, verwendet (Abb. 13). Bei der Auswertung der *Anti-CD45-Färbung* mittels *Area Fraction* konnten keine signifikanten Unterschiede bei den *SMC Has3-KO* (A) oder den *Villin Has3-KO* Tieren (B) und deren *WT* detektiert werden.

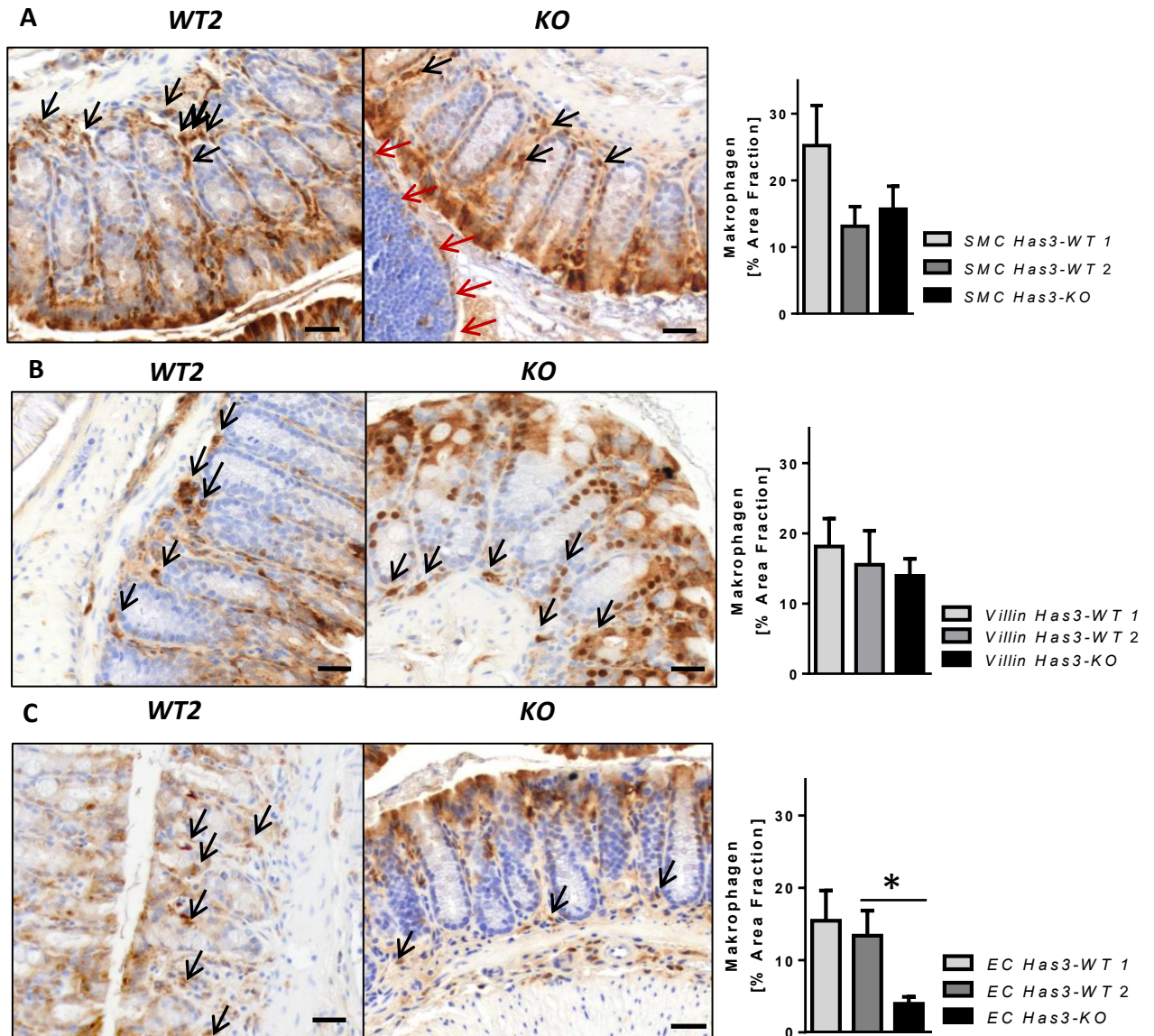


Im Gegensatz dazu zeigte sich eine signifikant ( $p= 0,0157$ ) geringere Anzahl an Leukozyten bei den Tieren mit *EC Has3-KO* (C) im Vergleich zu ihren Kontrollen *WT*. Dies spricht für eine geringer ausgeprägte Kolitis in der Gruppe mit *EC Has3-KO*. Beispielhafte Aufnahmen der Darmabschnitte und die ausgewerteten Daten sind in Abb. 13 zu sehen.



**Abb. 13 Geringere Leukozyteninvasion bei Mäusen mit endotheliale Defizit der Hyaluronsäuresynthase 3**

Die Bilder zeigen repräsentative Aufnahmen der Darmschnecken in immunhistochemischer *Anti-CD45-Färbung*. Die positiv gefärbten Flächen im Darmgewebe entsprechen Leukozyten und wurden im Verhältnis zur gesamten Auswertungsfläche im nebenstehenden Balkendiagramme dargestellt. Die Diagramme zeigen den Vergleich von Mäusen mit *Knockout* (*KO*) der Hyaluronsäuresynthase (*Has3*) in den glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, *SMC*; **A**), den Epithelzellen (*Villin*; **B**) und den Endothelzellen (*endothelial cells*, *EC*; **C**) mit deren jeweiligen Kontrollen (Wildtypen, *WT*). *WT* entspricht hierbei der Kontrollgruppe *WT2*. Alle Bilder wurden in 400-facher Vergrößerung aufgenommen, der Maßstab entspricht 25 $\mu$ m. Der schwarze Pfeil ( $\rightarrow$ ) lokalisiert angefärbte Makrophagen, rote Pfeile ( $\rightarrow$ ) deuten auf Lymphfollikel. Die Ergebnisse zeigen Mittelwert  $\pm$  SEM nach Mann-Whitney; A: n=11,8; B: n=5, 10 C; n=9,11; \* $p<0,05$ .



**Abb. 14 Signifikant geringere Makrophageninfiltration bei endothelspezifischer Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3**

Die Bilder zeigen repräsentative Aufnahmen der Darmschnecken in immunhistochemischer *Anti-Mac2-Färbung*. Die positiv gefärbten Flächen im Darmgewebe entsprechen Makrophagen und wurden im Verhältnis zur gesamten Auswertungsfläche im nebenstehenden Balkendiagramme dargestellt. Die Diagramme zeigen den Vergleich von Mäusen mit *Knockout (KO)* der Hyaluronsäuresynthase (*Has3*) in den glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells, SMC*; **A**), den Epithelzellen (*Villin*; **B**) und den Endothelzellen (*endothelial cells, EC*; **C**) mit deren jeweiligen Kontrollen (Wilypen, *WT1* und *WT2*). Alle Bilder wurden in 400-facher Vergrößerung aufgenommen, der Maßstab entspricht 25µm. Der schwarze Pfeil (→) lokalisiert angefärbte Makrophagen, rote Pfeile (→) deuten auf Lymphfollikel. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM nach Mann-Whitney; A: n=8,11,8; B: n=11,5, 11 C: n=11,9,11 \**p*<0,01

Bei der Betrachtung der Makrophagen mittels *Anti-Mac2*-Färbung ergaben sich in den Gruppen mit *SMC Has3-KO* (A) sowie mit *Villin Has3-KO* (B) und deren jeweiligen *WT1* und *WT2* keine Unterschiede. Hingegen zeigte sich eine signifikant ( $p=0,0079$ ) um circa 9% geringere Makrophagenanzahl bei den *EC Has3-KO* Tieren (C) im Vergleich zu ihren *WT2*. Auch im Vergleich zu ihren *WT1* ergab sich ebenfalls ein deutlicher Trend (Mann-Whitney,  $p=0,055$ ) zu weniger Makrophagen im Darmgewebe der *KO*-Gruppe. Die Aufnahmen der Darmabschnitte in Abb. 14 sollen diesen Unterschied beispielhaft verdeutlichen.

## 4 Diskussion

Bei entzündlichen Prozessen wie chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen spielen Komponenten der EZM wie HA und ihre Synthesen eine wichtige Rolle. Aus Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe [81] und den Arbeiten von Kessler *et al.* ist bekannt, dass eine ubiquitäre Deletion der *Has3* im Rahmen einer DSS-induzierten Kolitis im Mausmodell zu einer geringeren Entzündungsaktivität mit geringerem Gewichtsverlust, weniger Kolonverkürzung, niedrigerem histologischem *Kolitis-Score* und geringerer Leukozyteninvasion führt [24].

Aufgrund dieser Erkenntnisse war Ziel der Arbeit, den für den protektiven Effekt einer *Has3*-Deletion verantwortlichen Zelltyp zu finden. Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit zelltypspezifischer Deletion der *Has3* in

1. glatten Muskelzellen
2. Epithelzellen
3. Endothelzellen

unter DSS-induzierter Kolitis mit ihren jeweiligen Kontrollen verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass am ehesten die spezifische Deletion der *Has3* in den Endothelzellen den protektiven Effekt einer ubiquitären *Has3*-Deletion nachahmen kann. Nun stellt sich die Frage, wie die Wirkung einer endothelzellspezifischen Deletion der *Has3* in den Zusammenhang dieses Entzündungsgeschehens gesetzt werden kann.

#### 4.1 Effekte der zelltypspezifischen Deletion der *Has3* in den glatten Muskelzellen oder Epithelzellen auf die akute Kolitis

Bei einer akuten Entzündung des Darms durchlaufen auch die glatten Muskelzellen der Mukosa verschiedene Veränderungen, wie z.B. eine Hyperplasie der Zellen. Die glatten Muskelzellen des Darms sind dazu in der Lage unter DSS-Kolitis vermehrt HA zu synthetisieren. Die von glatten Muskelzellen produzierte HA bildet jedoch nach bisherigem Kenntnisstand nur unter viralem Stimulus kabelähnliche Strukturen aus, an die Leukozyten über ihren CD44-Rezeptor binden können. Unter entzündlichen Bedingungen, wie z.B. durch Stimulation mit IL-6, konnte dieser Prozess noch nicht gezeigt werden [33]. Möglicherweise kommt es daher durch die DSS-induzierte Kolitis ebenfalls nicht zu der Ausbildung dieser proentzündlichen Strukturen.

In der Versuchsgruppe der Mäuse mit *Has3*-Deletion in den glatten Muskelzellen scheint das Fehlen der *Has3* sogar eher einen negativen Effekt auf den Krankheitsverlauf zu haben. So zeigte sich bei der Analyse des Darmgewicht/Darmlänge-Quotienten, dass in dieser Gruppe ein signifikant erhöhter Quotient und somit eine ausgeprägtere Entzündung besteht. Ebenso konnte eine erhöhte Entzündungsaktivität im Blut durch eine erhöhte Anzahl an Leukozyten gesehen werden. Die *Has3* und die von ihr synthetisierte HA könnten in den glatten Muskelzellen daher sogar eine entzündungshemmende Funktion innehaben.

Ein weiterer Erklärungsansatz der negativen Wirkung einer *Has3*-Deletion ist möglicherweise eine kompensatorische Hochregulation von anderen Synthesen, insbesondere der *Has2* und der von ihr produzierten HA. Diese scheint zudem die dominante Synthese bei mesenchymalen Zellen zu sein, wozu die glatten Muskelzellen gezählt werden [24, 111]. Bei Mäusen mit *Has1/Has3* defizienten dermalen Fibroblasten konnten Wang *et al.* 2014 eine solche Hochregulation beobachten. Hier führte eine *Has1/Has3*-Deletion zur schnelleren Wundheilung [112]. Ob dies jedoch auf andere Gewebe und Zelltypen zutrifft, konnte bisher nicht gezeigt werden und könnte ein Ansatz für weitere Analysen sein.

Das Epithel der Darmmukosa hat verschiedene Funktionen, wobei eine der Hauptfunktionen der Schutz des darunterliegenden Gewebes vor pathogenen Keimen des Darmlumens ist. Mittlerweile wird die Epithelschicht sogar als



„Kommunikationsschicht“ gesehen, über welche Immunantworten reguliert werden können [84]. So bilden die Epithelzellen z.B. Abwehrstoffe, wie Defensine, die gegen Bakterien, Viren und Pilze wirksam sind. Für das antimikrobiell wirksame H $\beta$ D2, welches in intestinalen Epithelzellen vorkommt, konnte bereits gezeigt werden, dass es vermehrt bei der Applikation von mittelgroßen (35.000 Dalton) HA gebildet wird. Durch die Applikation der HA konnte hiermit die antimikrobielle Wirkung der Epithelschicht gestärkt werden. Dies konnten Hill et. al sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Mausmodell zeigen [87]. Hier wurde jedoch nur HA appliziert und nicht die Synthese durch insbesondere *Has3* untersucht. In diesem engeren Zusammenhang gibt es bisher keine vergleichbaren konkreten Versuchsansätze. In unserem Ansatz konnte kein Effekt durch eine Deletion der *Has3* in den Epithelzellen auf die akute Kolitis beobachtet werden. Vermutlich spielt die *Has3* der Epithelzellen keine führende Rolle in der akuten Kolitis.

#### **4.2    Protektiver Effekt der endothelzellspezifischen Deletion der *Has3***

Der protektive Effekt einer zelltypspezifischen *Has3*-Deletion in den Endothelzellen konnte in dieser Arbeit durch die Untersuchung verschiedener Parameter gezeigt werden. So konnten schon unter der Induktion der Kolitis mittels DSS anhand des Gewichtsverlaufs der Mäuse signifikante Unterschiede gesehen werden. Der Gewichtsverlauf im Mausmodell diente der Kontrolle des Befindens der Mäuse und der Quantifizierung des Krankheitsverlaufs, wobei die Gewichtsabnahme mit der Schwere der Kolitis korrelierte. Ein protektiver Effekt einer zelltypspezifischen Deletion der *Has3* sollte daher im Umkehrschluss zu einer geringer ausgeprägten Gewichtsabnahme führen. Ein Gewichtsverlust ist auch für Patient/-innen mit CED charakteristisch. Sowohl bei akuten Entzündungsschüben als auch aufgrund der durch die Kolitis induzierten chronischen Malabsorptions- und Maldigestionssyndrome kommt es zu einem Gewichtsverlust, so dass das Mausmodell dem Krankheitsverlauf der betroffenen Patient/-innen in diesem Punkt ähnelt. In allen Versuchsgruppen konnte ein Abfall des Körpergewichts unter der DSS-Applikation beobachtet werden, wobei sich ein signifikanter Unterschied bei den Mäusen mit endothelialem *Has3*-KO und ihren Kontrollen zeigte mit geringem Gewichtsverlust in der *KO*-Gruppe. Eine endothelzellspezifische Deletion der *Has3* scheint daher protektiv zu wirken.

Während der akuten Entzündung des Darms kommt es zudem zur ödematösen Aufschwemmung und narbigen Verkürzung des Darms. Dies kann auch zur weiteren Graduierung des Schweregrads der Kolitis herangezogen werden, wobei ein verkürzter und schwerer Darm für eine gesteigerte Entzündungsaktivität spricht. Neben dem Vergleich der Darmlänge und des Darmgewichts entschieden wir uns zusätzlich dazu einen Quotienten aus Darmgewicht und Darmlänge zu bilden, in der Annahme, dass ein erhöhter Wert des Quotienten Zeichen einer ausgeprägteren Entzündungsreaktion ist. In der Gruppe mit endothelzellspezifischer Deletion der *Has3* konnten jedoch, anders als vermutet war, kein signifikanter Unterschied im Darmgewicht/ Darmlänge-Quotienten gesehen werden. Betrachtet man jedoch die Einzelergebnisse, so fällt auf, dass in der Kontrollgruppe ein erhöhtes Darmgewicht bestand, dies aber auch auf einen verlängerten Darm zurückzuführen war. Dies zeigt, dass ein Verhältnis aus Darmgewicht und Darmlänge aussagekräftigere Ergebnisse liefert als die Betrachtung der Einzelwerte, da der Quotient weniger anfällig ist für andere beeinflussende Faktoren, wie z.B. die Körpergröße der Mäuse.

Auch in der mikroskopischen Betrachtung der Kolitis konnte eine deutlich geringer ausgeprägte Kolitis bei den Mäusen mit endothelzellspezifischer *Has3*-Deletion gesehen werden. In die Beurteilung der Schwere der Entzündungsreaktion gingen in der histologischen Betrachtung zuvor festgelegte Parameter ein. Untersucht wurde der terminale Abschnitt (1000µm) des Kolons und Rektums, da hier durch die bakterielle Besiedlung eine Interaktion von Bakterien mit der EZM und den enthaltenen Zellen stattfinden kann [24, 113]. Histologische Punktesysteme zur Beurteilung der Schwere der Entzündung sind gängige Praxis, sowohl im Bereich der Routinediagnostik der CED als auch in der Forschung [114]. Die Kriterien des verwendeten histologischen Punktesystems wurden bereits in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe [81] verwendet und richten sich nach Lahat *et al.* 2007 [109]. Auch Kessler *et al.* [24] wählten ähnliche Kriterien: Kriptenstruktur, epithelialer Zellverband, die Infiltration von Leukozyten und die Verbreiterung der Submukosa und der Muscularis mucosae. Darüber hinaus wurden Veränderungen der Gefäßgröße, -anzahl und -verteilung festgehalten. Umso stärker ausgeprägt die Entzündung war, desto höher fiel der Punktwert aus. Das Ergebnis dieser Arbeiten war, dass eine ubiquitäre Deletion der *Has3* zu signifikant

geringeren Werten führt. In der hier vorliegenden Arbeit konnten wir darüber hinaus zeigen, dass diese Ergebnisse auf einen *Has3-KO* in den Endothelzellen zurückzuführen sind, da sich bei diesem Zelltyp ebenfalls signifikant geringere Werte im *Kolitis-Score* ergaben.

Die Bestimmung von Leukozyten im Blut ist nicht nur in der experimentellen sondern auch in der klinischen Diagnostik etabliert und bietet daher die Möglichkeit Mausmodelle mit der klinischen Situation eines Erkrankten zu vergleichen, wobei eine erhöhte Anzahl an Leukozyten für eine vermehrte Inflammation spricht. Im Blut der behandelten Mäuse mit endothelzellspezifischer Deletion der *Has3* konnte ein deutlicher Trend zu geringeren Anzahl an zirkulierenden Leukozyten gesehen werden. Da es sich um nur eine geringe Anzahl untersuchter Blutbilder handelt, bleibt anzunehmen, dass Blutanalysen weiterer Mäuse eine signifikant geringer ausgeprägte Inflammation bestätigt hätten.

Darüber hinaus konnten wir nachweisen, dass bei einem *Has3-KO* in den Endothelzellen signifikant weniger Leukozyten, vor allem Makrophagen, in die Mukosa des Darms einwandern. Dies kann als Zeichen einer geringer ausgeprägten Entzündung gewertet werden. Sowohl Kessler *et al.* als auch wir in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnten beobachten, dass bei akuter Kolitis die Submukosa aufgelockert und verbreitert wird [24, 81]. Diese Beobachtung stellte sowohl mesenchymale Zellen der EZM als auch die einwandernden Entzündungszellen, wie Makrophagen, in den Fokus. In weiterführenden Versuchen konnten Kessler *et al.* zeigen, dass durch einen viralen Stimulus eine Veränderung der HA stattfindet. Es bilden sich kabelähnliche Strukturen in der Submukosa aus, an welche Monozyten über ihren CD44-Rezeptor binden können. HA dient hier demnach der Leukozytenadhäsion im Gewebe. Ein vermehrtes Vorkommen von an HA gebundene CD-44-positive Leukozyten konnte auch in akut entzündetem Darmgewebe im Vergleich zu nicht entzündetem Gewebe bei Patient/-innen mit CED gesehen werden [31-33]. Somit spricht eine geringere Anzahl von Leukozyten, insbesondere von Makrophagen, im Darmgewebe der Mäuse mit endotheliale *Has3*-Defizit für eine geringere Ausprägung der Kolitis und unterstreicht den protektiven Effekt.

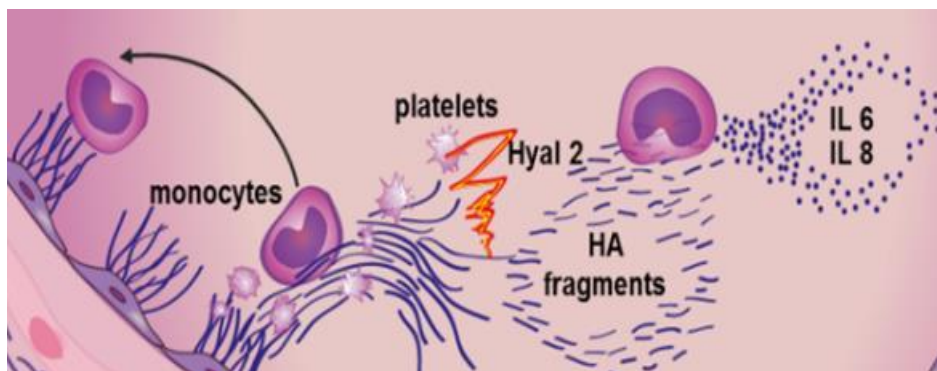
Nun stellt sich die Frage wie ein möglicher Wirkmechanismus des protektiven Effektes der endothelzellspezifischen *Has3*-Deletion aussehen könnte. Dies soll im Folgenden näher erläutert werden.

Es ist bereits bekannt, dass bei Patient/-innen mit CED im Stadium der akuten Entzündung eine gesteigerte Durchblutung des Darms zu beobachten ist. Bei akuter Kolitis kommt es zudem durch Hypoxie zur Dilatation der Gefäße. Dieser Zustand im Gewebe führt über die Freisetzung von Botenstoffen zum Einsprossen weiterer Gefäße [98, 101]. Auch niedermolekulare HA kann zur Angiogenese anregen [26, 70, 74, 75, 115]. Diese niedermolekulare HA entsteht meist durch Spaltung von hochmolekulare HA durch HYAL und KIAA1199 und kann sowohl proangiogenetisch als auch proinflammatorisch wirken [58, 63]. Zudem konnten Kessler *et al.* bereits zeigen, dass ein ubiquitäres Defizit der *Has3*, nicht jedoch der *Has1*, zu einer geringer ausgeprägten Kolitis unter DSS im Mausmodell führt [24]. Zuvor beobachteten sie, dass unter Stimulation mit TNF- $\alpha$  HIMECs vermehrt HA bilden und auch die *HAS3* mRNA gesteigert vorkommt. Diese von Endothelzellen exprimierte *HAS3* war nun dazu in der Lage HA zu produzieren, die ins Lumen der Gefäße abgesondert wird. Dieser Prozess geht anderen Umbauprozessen der EZM, wie z.B. der HA-Synthese durch mesenchymale Zellen, zeitlich voraus [32]. Im Lumen der kleinen intestinalen Gefäße hat die HA darüber hinaus auch Kontakt zu zirkulierenden Zellen des Blutes, wie z.B. Thrombozyten und Monozyten.

Thrombozyten interagieren mit HA und können so zur Inflammation bei CED beitragen. Schon seit längerem gibt es Belege dafür, dass Thrombozyten nicht nur in der Hämostase und Wundheilung eine wichtige Rolle spielen, sondern auch bei der Entstehung und Progression von Entzündungen von Bedeutung sind [116, 117]. Bei Patient/-innen mit CED kommt es auch zu Veränderungen bezüglich der Konzentration, Verteilung und Funktion von Thrombozyten. So findet sich im Blut von CED-Erkrankten mit akutem Schub eine erhöhte Konzentration an Thrombozyten [118] und kann sogar zur Differenzierung zwischen CED und infektiösen Diarrhöen genutzt werden [119, 120]. Der Anstieg von Thrombozyten ist typisch für chronisch entzündliche Erkrankungen und tritt nicht nur bei CED auf. Wie es zum Anstieg kommt ist bisher noch weitgehend unklar [117]. Im akuten Entzündungsgeschehen von CED

entstehen in den kleinen Gefäßen der Mukosa und Submukosa Mikrothromben, die zur Ischämie der betroffenen Abschnitte führen. Im Unterschied zu anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen konnten bisher nur bei CED zirkulierende Thrombozyten-Aggregate gefunden werden. Dies scheint somit eine Besonderheit der CED zu sein [121]. Darüber hinaus können Thrombozyten über eine Interaktion mit HIMECs und deren Freisetzung von Faktoren wie IL-8 die Aktivierung und Aggregation von Leukozyten induzieren [122].

Anders als andere Zellen beinhalten Thrombozyten nur HYAL2 und keine HYAL1. De la Motte *et al.* konnten zeigen, dass Thrombozyten nach der Bindung von HA, die zuvor am Endothel von kleinen Gefäßen im Darm synthetisiert wurde, diese über HYAL2 zu kleinen Fragmenten abbaut. Von diesen kleineren HA-Fragmenten wurde nun zunächst angenommen, dass sie selbst proinflammatorisch wirken und Monozyten aktivieren. Diese sollten infolgedessen proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie IL-6 und IL-8 freisetzen. Die Zytokine wiederum führen zur Aktivierung weiterer Leukozyten und zu ihrer Einwanderung ins Gewebe. Zudem werden Endothelzellen zur Synthese von HA angeregt, so kommt es zur Wiederholung des Kreislaufes und zum Aggravieren der Entzündung [78]. Dieser Vorgang soll in der Abb. 15 verdeutlicht werden.



**Abb. 15 Zusammenhang von Endothelzellen, Thrombozyten und Hyaluronsäure bei akuten Entzündungen**

Die Abbildung zeigt, dass endothelial synthetisierte Hyaluronsäure (HA) im Lumen der Gefäße mit Thrombozyten interagiert. Mit Hilfe der thrombozytären Hyaluronidase 2 (HYAL2) kann HA zu kleineren Fragmenten gespalten werden, welche im Verdacht stehen, die Angiogenese anregen und Monozyten aktivieren zu können und so wiederum die Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren wie Interleukin (IL)-6 oder IL-8 induzieren zu können. Nach aktuellen Erkenntnissen könnte die Spaltung der HA durch die HYAL2 der Thrombozyten jedoch eine entgegengesetzte Wirkung haben und die Invasion der Leukozyten verhindern.

Nach neueren Erkenntnissen scheint dieser Vorgang jedoch komplexer zu sein. So konnte die Arbeitsgruppe um Petry *et al.* im Jahre 2019 zeigen, dass die thrombozytäre HYAL2 bei Patient/-innen mit CED vermindert vorkommt und in ihrer Funktion gestört zu sein scheint. In Versuchen mit Mäusen mit Defizit der HYAL2 konnten sie zeigen, dass diese deutlich anfälliger waren für eine DSS induzierte Kolitis als ihre Wildtypen. Nach Transfusion von gesunden Thrombozyten konnte dieser Effekt revidiert werden. Diese Erkenntnisse ließen sich mit HIMECs von betroffenen Patient/-innen reproduzieren [123] und legten somit nahe, dass die HYAL2 der Thrombozyten durch die Degradation der endothelial produzierten HA die Aktivierung und Einwanderung der Leukozyten verhindern kann. Dieser Prozess ist bei Erkrankten gestört und führt so zur vermehrten Entzündungsreaktion. Der protektive Effekt eines *Has3-KO* in den Endothelzellen könnte nun darin begründet sein, dass die Endothelzellen keine proinflammatorische HA mehr produzieren, so dass ein anschließender Abbau durch die HYAL2 nicht mehr stattfinden muss. Bei Betroffenen mit CED hätte daher eine verminderte Anzahl oder dysfunktionale HYAL2 keinen Einfluss mehr auf eine Leukozyten-Einwanderung und so wäre der Pathomechanismus von Beginn an unterbrochen.

Eine alternative Erklärung wäre, dass die *Has3* der Endothelzellen nicht die Synthese der HA ins Lumen der Gefäße steuert, sondern eher die HA-Zusammensetzung an der Glykokalyx des Endothels. Die Glykokalyx der Endothelzellen nimmt eine wichtige Rolle als Grenzschicht zwischen Endothelzellen und den zirkulierenden Zellen des Blutes ein. Zu ihren Bestandteilen gehören Glykosaminoglykane wie HA [124]. Unter pathologischen Zuständen, wie z.B. bei Arteriosklerose, Diabetes mellitus, Ischämie und Reperfusion oder Sepsis konnte bereits beobachtet werden, dass die Integrität der Glykokalyx gestört ist. Durch verschiedene Mechanismen kommt es zur Modulation und teilweise Zerstörung der Glykokalyx. Hierdurch werden Adhäsionsmoleküle freigelegt, die nun die Aktivierung, Adhäsion und Migration von Leukozyten und Thrombozyten fördern. Ebenso kommt es zur Spaltung der HA in kleinere Fragmenten, welche proinflammatorisch wirken und Monozyten aktivieren können [125, 126]. Durch die Hemmung der endothelialen HA-Synthese könnte hier die Interaktion mit den Leukozyten, insbesondere den zirkulierenden Monozyten

beeinflusst werden. Der Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion und CED steht seit längerem im Fokus der Forschung [127], wobei der genauen Zusammensetzung der endothelialen Glykokalyx bei akuter Kolitis bisher kaum Beachtung geschenkt wurde und somit einen Ansatz für weiterführende Studien bieten könnte.

Interessanterweise werden in der Therapie von chronisch entzündlichen Erkrankungen bereits Antikörper gegen Integrine (z.B. Natalizumab, Vedolizumab) eingesetzt, die die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel hemmen. Weitere Medikamente mit ähnlichem Wirkmechanismus, wie z.B. Etrolizumab, ein Antikörper gegen die  $\beta$ 7-Untereinheit der Integrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 und  $\alpha$ E $\beta$ 7, werden bereits im Rahmen von klinischen Studien erprobt [128]. Somit ist die Beeinflussung der Interaktion der Endothelzellen und der Leukozyten bereits fester Bestandteil der Therapie von Patient/-innen mit CED.

Daneben konnte auch an mit TNF- $\alpha$  stimulierten HIMECs die vermehrte Expression von *Has3* mRNA beobachtet werden. Darüber hinaus wurde im Darmgewebe von Patient/-innen mit CED eine Absonderung von HA ins Gefäßlumen festgestellt [32]. Diese *in vitro* beobachteten Prozesse an humanen Zellen sowie Analysen des Darmgewebes Betroffener legen nahe, dass das von uns im Mausmodell vermutete Zusammenspiel von Endothelzellen, *Has3*, HA, Thrombozyten und zirkulierenden Monozyten durchaus die Entzündungsprozesse beim Menschen *in vivo* widerspiegeln könnte. Somit könnte die Blockierung der endothelialen *Has3* und der von ihr synthetisierten HA als weiterer therapeutischer Ansatzpunkt dienen und so die Therapie von CED erweitern. Um die Übertragbarkeit auf den Menschen zu bestätigen und den protektiven Effekt der *Has3*-Blockade zu nutzen, müsste eine pharmakologische Inhibition der endothelspezifischen *Has3* entwickelt werden.

### 4.3 Limitationen der Arbeit und Ausblick

Eine der Limitationen dieser Arbeit besteht sicherlich in der Übertragbarkeit der Versuche im Mausmodell auf den Menschen. In unserem Versuchsaufbau wird eine Kolitis durch DSS induziert, welches ein anerkanntes murines Modell zur Induktion einer akuten Kolitis darstellt. Die zugrundeliegende Pathogenese unterscheidet sich jedoch deutlich von der klinischen Situation. Beim Menschen ist bisher nicht geklärt wie im Einzelnen die Entstehung einer Kolitis abläuft, jedoch werden verschiedene Faktoren diskutiert, wie genetische Prädisposition, Umweltfaktoren, Rauchen oder Antibiotikaeinnahme. Ebenso spielen Fehlleistungen des Immunsystems auf die Darmflora eine wichtige Rolle. Im murinen Modell einer durch DSS induzierten Kolitis wirken die DSS-Polymere sowohl direkt toxisch auf die Epithelzellen des Darms als auch indirekt über eine Dysfunktion der antibakteriellen Barriere [129]. Innerhalb weniger Tage kommt es zu blutigen Durchfällen, Ulzerationen und der Infiltration der EZM durch Immunzellen [110, 130]. Hierbei spielen vor allem Mechanismen der angeborenen Immunabwehr und weniger des erworbenen Immunsystems, zu welchem z.B. B- Zellen und T-Zellen gehören, eine Rolle [113]. Durch dieses Modell kann die akute Kolitis von CED-Patient/-innen nur nachgeahmt werden, weshalb nicht sichergestellt werden kann, dass die Entzündungsprozesse im Menschen durch die gleichen Mechanismen beeinflusst werden. Ebenso gibt es Unterschiede in der Zusammensetzung und Funktionsweise des Immunsystems der Maus im Vergleich zum Menschen. So ist z.B. das menschliche Blut reich an Neutrophilen wogegen bei der Maus die Lymphozyten deutlich überwiegen. Neutrophile setzen im Menschen viele Defensine frei, welche für die Immunantwort in Epithelzellen des Darms und der Haut von Bedeutung sind, wohingegen sie diese Funktion in der Maus nicht ausführen. Hier überwiegt dafür die Produktion von Defensinen durch die Paneth'schen Körnerzellen [131]. Des Weiteren handelt es sich in diesem Modell um genetisch modifizierte Mäuse. Möglicherweise werden schon durch die genetische Modifizierung Veränderungen im Immunsystem der Maus verursacht, die Einfluss auf die Entzündungsreaktion nehmen können.

Neben der Bestimmung von Leukozyten im Blut gibt es weitere Parameter, die eine Aussage über die Stärke einer Entzündungsreaktion im Rahmen einer akuten oder



chronischen Kolitis zulassen und eine wichtige Rolle im Pathomechanismus einer Inflammation spielen. Hierzu zählen beispielsweise das C-Reaktive Protein (CRP), IL-6 [132] oder TNF- $\alpha$  [133]. Das Zytokin TNF- $\alpha$  ist nicht nur für die Einschätzung der Schwere der Entzündung von Bedeutung, sondern steht in direktem Zusammenhang mit der Pathogenese der Entzündungsreaktion. So konnten Zheng *et al.* zeigen, dass unter DSS-Kolitis und Applikation von HA (7500 Dalton) Peritoneal-Makrophagen vermehrt TNF- $\alpha$  produzieren und auch die Proliferationen der Makrophagen selbst stimuliert wird [88]. Die Bedeutung von TNF- $\alpha$  wird noch deutlicher im Erfolg der Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper, wie Infliximab oder Adalimumab, die momentan bei Erkrankungen, wie Morbus Crohn oder Colitis ulzerosa erfolgreich eingesetzt werden. Sie beschleunigen das Ansprechen der Therapie und verlängern die Remission im Vergleich zu Placebos [134]. Somit könnten weitere Entzündungsmarker wie IL-6, CRP oder TNF- $\alpha$  bei weiteren Versuchen zur Einschätzung und Quantifizierung der Schwere der Entzündung bestimmt werden.

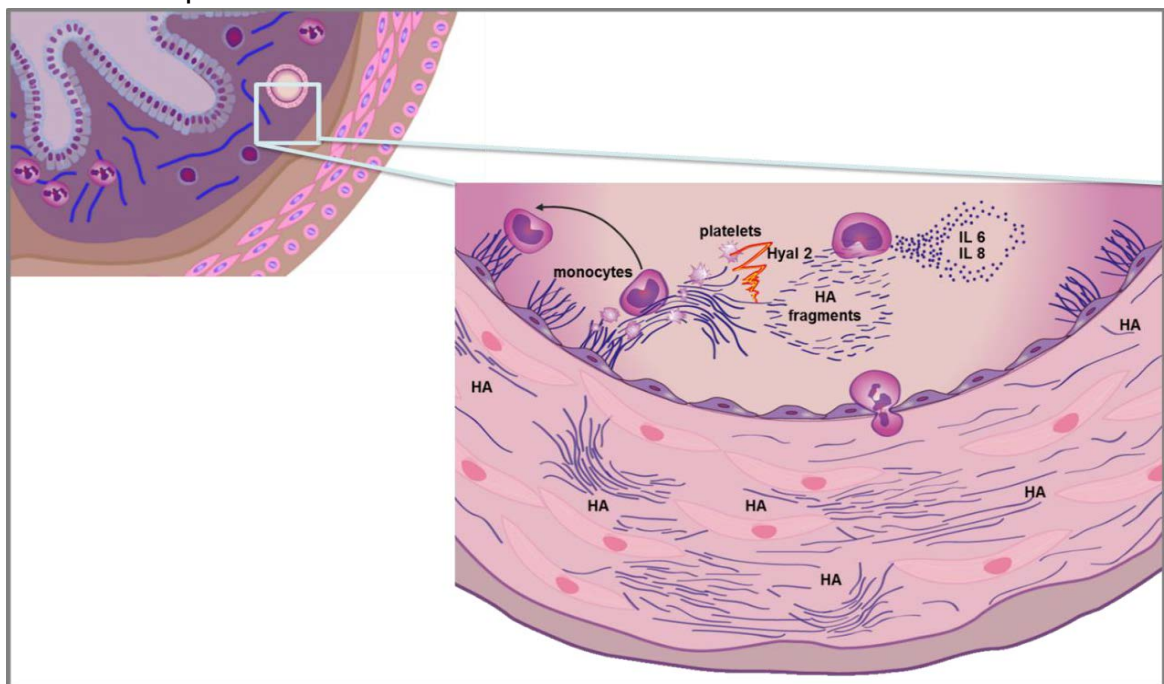
Neben den untersuchten Parametern gibt es mittlerweile weitere Faktoren, die in Zusammenhang mit CED gesetzt werden konnten. Hierzu gehört das von Fibroblasten produzierte Protein KIAA1199, welches auch für die Degradierung von HA verantwortlich ist [58]. Es spielt eine Rolle bei verschiedenen Erkrankungen, unter anderem auch bei CED [63]. KIAA1199 spaltet HA zu kleineren Fragmenten, wobei dies erstaunlicherweise anders als bei HYAL unabhängig vom CD44-Rezeptor geschieht. Es sind bereits mehrere Erkrankungen beschrieben, bei denen KIAA1199 stärker exprimiert wird. Hierzu gehören z.B. entzündliche Erkrankungen der Gelenke [58], aber auch Neoplasien im Magen-Darmtrakt. In neoplastischem Kolongewebe wird KIAA1199 unterschiedlich stark exprimiert, wobei im Plasma der Patient/-innen mit Karzinomen oder Adenomen im Vergleich zu Gesunden vermehrt KIAA1199 gefunden werden konnte [135]. Durch die Spaltung hochmolekularer HA in kleinere Fragmente, welche proinflammatorisch wirken können, kann das Entzündungsgeschehen beeinflusst werden [74]. Bei akuter Kolitis findet eine solche Spaltung auch durch KIAA1199 statt [63]. Soroosh *et al.* stimulierten intestinale Fibroblasten von Patient/-innen mit Morbus Crohn mit IL-6. In Folge wurde KIAA1199 bei diesen Patient/-innen im Vergleich zur Kontrollgruppe übermäßig stark exprimiert. Außerdem konnten bei

Patient/-innen mit Morbus Crohn erhöhte Spiegel an niedermolekularer HA gemessen werden. Das Gen KIAA1199 ist erst seit wenigen Jahren bekannt und wird noch nicht lange in Zusammenhang mit HA und Kolitis gebracht. Daher hat eine Bestimmung des KIAA1199 auch keinen Eingang in diese Arbeit gefunden. In weiterführenden Arbeiten könnte die Bestimmung von KIAA1199 aber durchaus von Bedeutung sein und die Entzündungsaktivität weiter charakterisieren. Interessant wäre z.B. inwiefern der Abbau von HA durch KIAA1199 im oder am Endothel stattfindet und ob eine Deletion der endothelialen *Has3* auch zur geringeren Expression von KIAA1199 und somit zur verminderten Spaltung von HA führen kann.

In dieser Arbeit konnte zudem beobachtet werden, dass ein zelltypspezifisches *Has3*-Defizit, anders als ein ubiquitäreres Defizit, auch einen negativen Einfluss auf den Verlauf einer Kolitis haben kann. Diese Vermutung ergab sich in Anbetracht der Ergebnisse in der Gruppe der Mäuse mit glattmuskulärem *Has3*-Defizit, wo eine verstärkte Entzündungsreaktion in der erhöhten Anzahl an zirkulierenden Leukozyten und einem erhöhten Darmgewicht/Darmlänge Quotienten gesehen werden konnte. Hier wären Ansätze für weitere Untersuchungen dieses Effektes, z.B. in der Quantifizierung der anderen Synthasen (*Has1*, *Has2*) unter *Has3*-Defizit, sinnvoll um den Verdacht zu klären, ob möglicherweise eine stärkere Expression einer anderen Synthese für diesen Effekt verantwortlich zu machen ist. Andererseits wäre es auch möglich, dass die *Has3* der glatten Muskelzellen in der akuten Entzündung eine eher entzündungshemmende Funktion innehat, was die Notwendigkeit einer zelltypspezifischen Blockierung der *Has3* hervorheben würde und für die Entwicklung einer dahin gehenden Therapie von CED interessant sein könnte.

#### 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Effekt eines ubiquitären *Has3-KO* am ehesten von einem zelltypspezifischen *Has3-KO* in den Endothelzellen widergespiegelt wird. In der Versuchsgruppe mit *Has3*-Deletion in den Epithelzellen konnte keine Wirkung gesehen werden, wobei eine Deletion der *Has3* in den glatten Muskelzellen sogar proinflammatorisch zu wirken scheint. Eine mögliche Erklärung für die protektive Wirkung einer Deletion der endothelialen *Has3* könnte sein, dass ohne sie vermindert HA in der Glykokalix der Endothelzellen sowie im Gefäßlumen vorliegt. Dort wird sie bei Gesunden durch die HYAL2 der zirkulierenden Thrombozyten abgebaut und so die Einwanderung von Leukozyten ins Gewebe zu verhindern. Dieser Mechanismus scheint jedoch bei CED gestört zu sein [123]. So kommt es hier über die von den Endothelzellen produzierte HA zur Aktivierung von zirkulierenden Monozyten. Diese setzen entzündungsvermittelnde Mediatoren wie IL-6 und IL-8 frei und fördern wiederum die Aktivierung weiterer Monozyten sowie die Proliferation und Migration von Endothelzellen (Abb. 16) [78, 136]. Dieser Kreislauf könnte demnach durch die Inaktivierung der endothelialen *Has3* unterbrochen werden und so möglicherweise als weiterer therapeutischer Ansatz bei CED dienen.



**Abb. 16 Die Rolle der endothelialen Hyaluronsäuresynthase 3 bei akuter Kolitis**

Die Interaktion der während einer akuten Kolitis endothelial produzierten Hyaluronsäure (HA) mit der thrombozytären Hyaluronidase (HYAL)-2 und den zirkulierenden Monozyten kann die Entzündungsreaktion u. a. über die Freisetzung von Interleukin (IL)-6 und IL8 gefördert werden. Durch eine Blockade der endothelialen Hyaluronsäuresynthase 3 kann dieser Pathomechanismus unterbrochen werden.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Wehkamp, J., *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*, in *Deutsches Ärzteblatt*. 2016.
2. McDowell, C. and S.S. Bhimji, *Bowel, Inflammatory Disease (IBD)*, in *StatPearls*. 2017, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
3. Bousvaros, A., et al., *Differentiating ulcerative colitis from Crohn disease in children and young adults: report of a working group of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the Crohn's and Colitis Foundation of America*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2007. **44**(5): p. 653-74.
4. Henriksen, M., et al., *Are there any differences in phenotype or disease course between familial and sporadic cases of inflammatory bowel disease? Results of a population-based follow-up study*. *Am J Gastroenterol*, 2007. **102**(9): p. 1955-63.
5. Pohl, C., A. Hombach, and W. Kruis, *Chronic inflammatory bowel disease and cancer*. *Hepatogastroenterology*, 2000. **47**(31): p. 57-70.
6. *[Updated S3-Guideline Colitis ulcerosa. German Society for Digestive and Metabolic Diseases (DGVS) - AWMF Registry 021/009]*. *Z Gastroenterol*, 2018. **56**(9): p. 1087-1169.
7. Fava, F. and S. Danese, *Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe?* *World J Gastroenterol*, 2011. **17**(5): p. 557-66.
8. Martini, E., et al., *Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2017. **4**(1): p. 33-46.
9. Alkim, C., et al., *Angiogenesis in Inflammatory Bowel Disease*. *Int J Inflam*, 2015. **2015**: p. 970890.
10. Kucharzik, T., et al., *August 2019 - AWMF-Registriernummer: 021-009*. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 2019. **57**(11): p. 1321-1405.
11. Marshall, J.K., et al., *Rectal 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010(1): p. Cd004115.
12. Sandborn, W.J., et al., *Budesonide foam induces remission in patients with mild to moderate ulcerative proctitis and ulcerative proctosigmoiditis*. *Gastroenterology*, 2015. **148**(4): p. 740-750.e2.
13. Ford, A.C., et al., *Efficacy of oral vs. topical, or combined oral and topical 5-aminosalicylates, in Ulcerative Colitis: systematic review and meta-analysis*. *Am J Gastroenterol*, 2012. **107**(2): p. 167-76; author reply 177.
14. Truelove, S.C. and L.J. Witts, *Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial*. *Br Med J*, 1955. **2**(4947): p. 1041-8.
15. Jarnerot, G., et al., *Infliximab as rescue therapy in severe to moderately severe ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled study*. *Gastroenterology*, 2005. **128**(7): p. 1805-11.
16. Lichtiger, S., et al., *Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(26): p. 1841-5.
17. Komaki, Y., et al., *Efficacy and Safety of Tacrolimus Therapy for Active Ulcerative Colitis; A Systematic Review and Meta-analysis*. *J Crohns Colitis*, 2016. **10**(4): p. 484-94.
18. Sandborn, W.J., et al., *Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis*. *The New England journal of medicine*, 2017. **376**(18): p. 1723-1736.
19. Grainge, M.J., J. West, and T.R. Card, *Venous thromboembolism during active disease and remission in inflammatory bowel disease: a cohort study*. *Lancet*, 2010. **375**(9715): p. 657-63.
20. Ford, A.C., et al., *Efficacy of 5-aminosalicylates in ulcerative colitis: systematic review and meta-analysis*. *Am J Gastroenterol*, 2011. **106**(4): p. 601-16.
21. Losurdo, G., et al., *Escherichia coli Nissle 1917 in Ulcerative Colitis Treatment: Systematic Review and Meta-analysis*. *J Gastrointest Liver Dis*, 2015. **24**(4): p. 499-505.

22. Komuro, T. and Y. Hashimoto, *Three-dimensional structure of the rat intestinal wall (mucosa and submucosa)*. Arch Histol Cytol, 1990. **53**(1): p. 1-21.
23. Petrey, A.C. and C.A. de la Motte, *The extracellular matrix in IBD: a dynamic mediator of inflammation*. Curr Opin Gastroenterol, 2017.
24. 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.
25. Joachim Rassow, K.H., Roland Netzker, Rainer Deutzmann, *Duale Reihe Biochemie*. Thieme, 2012(3.).
26. Fraser, J.R., T.C. Laurent, and U.B. Laurent, *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*. J Intern Med, 1997. **242**(1): p. 27-33.
27. Genasetti, A., et al., *Hyaluronan and human endothelial cell behavior*. Connect Tissue Res, 2008. **49**(3): p. 120-3.
28. Toole, B.P., *Hyaluronan in morphogenesis*. J Intern Med, 1997. **242**(1): p. 35-40.
29. Itano, N., et al., *Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3609-14.
30. DeAngelis, P.L., *Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses*. Cell Mol Life Sci, 1999. **56**(7-8): p. 670-82.
31. 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.
32. Kessler, S., et al., *Hyaluronan (HA) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation*. Clin Transl Sci, 2008. **1**(1): p. 57-61.
33. de La Motte, C.A., et al., *Mononuclear leukocytes preferentially bind via CD44 to hyaluronan on human intestinal mucosal smooth muscle cells after virus infection or treatment with poly(I.C)*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30747-55.
34. Spicer, A.P., et al., *Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes*. Genomics, 1997. **41**(3): p. 493-7.
35. Tien, J.Y. and A.P. Spicer, *Three vertebrate hyaluronan synthases are expressed during mouse development in distinct spatial and temporal patterns*. Dev Dyn, 2005. **233**(1): p. 130-41.
36. Itano, N., et al., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 25085-92.
37. Triggs-Raine, B. and M.R. Natowicz, *Biology of hyaluronan: Insights from genetic disorders of hyaluronan metabolism*. World J Biol Chem, 2015. **6**(3): p. 110-20.
38. Weigel, P.H. and P.L. DeAngelis, *Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases*. J Biol Chem, 2007. **282**(51): p. 36777-81.
39. Ontong, P., et al., *Effect of a cholesterol-rich lipid environment on the enzymatic activity of reconstituted hyaluronan synthase*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **443**(2): p. 666-71.
40. Tammi, R.H., et al., *Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis*. Febs j, 2011. **278**(9): p. 1419-28.
41. Karousou, E., et al., *The activity of hyaluronan synthase 2 is regulated by dimerization and ubiquitination*. J Biol Chem, 2010. **285**(31): p. 23647-54.
42. Torronen, K., et al., *Tissue distribution and subcellular localization of hyaluronan synthase isoenzymes*. Histochem Cell Biol, 2014. **141**(1): p. 17-31.
43. Oguchi, T. and N. Ishiguro, *Differential stimulation of three forms of hyaluronan synthase by TGF-beta, IL-1beta, and TNF-alpha*. Connect Tissue Res, 2004. **45**(4-5): p. 197-205.
44. Stuhlmeier, K.M. and C. Pollaschek, *Differential effect of transforming growth factor beta (TGF-beta) on the genes encoding hyaluronan synthases and utilization of the p38 MAPK pathway in TGF-beta-induced hyaluronan synthase 1 activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 8753-60.

45. Siiskonen, H., et al., *Hyaluronan synthase 1: a mysterious enzyme with unexpected functions*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 43.
46. Malaisse, J., et al., *Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(8): p. 2174-82.
47. 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.
48. Zhu, X., et al., *A novel mutation of Hyaluronan synthase 2 gene in Chinese children with ventricular septal defect*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e87437.
49. Matsumoto, K., et al., *Conditional inactivation of Has2 reveals a crucial role for hyaluronan in skeletal growth, patterning, chondrocyte maturation and joint formation in the developing limb*. Development, 2009. **136**(16): p. 2825-35.
50. Tian, X., et al., *High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat*. Nature, 2013. **499**(7458): p. 346-9.
51. 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.
52. 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.
53. Stern, R., *Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?* Glycobiology, 2003. **13**(12): p. 105r-115r.
54. Fraser, J.R., et al., *Elimination of hyaluronic acid from the blood stream in the human*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1984. **11**(1): p. 17-25.
55. Banerji, S., et al., *LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan*. J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 789-801.
56. Goerdts, S., et al., *Identification of a novel high molecular weight protein preferentially expressed by sinusoidal endothelial cells in normal human tissues*. J Cell Biol, 1991. **113**(6): p. 1425-37.
57. Harris, E.N. and F. Cabral, *Ligand Binding and Signaling of HARE/Stabilin-2*. Biomolecules, 2019. **9**(7).
58. Yoshida, H., et al., *KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(14): p. 5612-7.
59. Stern, R. and M.J. Jedrzejewski, *Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action*. Chem Rev, 2006. **106**(3): p. 818-39.
60. 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.
61. 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.
62. Natowicz, M.R., et al., *Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency*. N Engl J Med, 1996. **335**(14): p. 1029-33.
63. Soroosh, A., et al., *Crohn's Disease Fibroblasts Overproduce the Novel Protein KIAA1199 to Create Proinflammatory Hyaluronan Fragments*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2016. **2**(3): p. 358-368.e4.
64. Comper, W.D. and T.C. Laurent, *Physiological function of connective tissue polysaccharides*. Physiol Rev, 1978. **58**(1): p. 255-315.

65. Monslow, J., et al., *Wounding-induced synthesis of hyaluronic acid in organotypic epidermal cultures requires the release of heparin-binding egf and activation of the EGFR*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(8): p. 2046-58.
66. Kavasi, R.M., et al., *HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease*. Food Chem Toxicol, 2017. **101**: p. 128-138.
67. DeGrendele, H.C., et al., *CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1119-30.
68. Ilangumaran, S., A. Briol, and D.C. Hoessli, *CD44 selectively associates with active Src family protein tyrosine kinases Lck and Fyn in glycosphingolipid-rich plasma membrane domains of human peripheral blood lymphocytes*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3901-8.
69. Fitzgerald, K.A., et al., *Ras, protein kinase C zeta, and I kappa B kinases 1 and 2 are downstream effectors of CD44 during the activation of NF-kappa B by hyaluronic acid fragments in T-24 carcinoma cells*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 2053-63.
70. Noble, P.W., et al., *Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages*. J Exp Med, 1996. **183**(5): p. 2373-8.
71. 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.
72. Hardwick, C., et al., *Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility*. J Cell Biol, 1992. **117**(6): p. 1343-50.
73. Song, J.M., et al., *Triptolide suppresses the in vitro and in vivo growth of lung cancer cells by targeting hyaluronan-CD44/RHAMM signaling*. Oncotarget, 2017. **8**(16): p. 26927-26940.
74. Stern, R., A.A. Asari, and K.N. Sugahara, *Hyaluronan fragments: an information-rich system*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(8): p. 699-715.
75. West, D.C. and S. Kumar, *Hyaluronan and angiogenesis*. Ciba Found Symp, 1989. **143**: p. 187-201; discussion 201-7, 281-5.
76. Brinck, J. and P. Helden, *Expression of recombinant hyaluronan synthase (HAS) isoforms in CHO cells reduces cell migration and cell surface CD44*. Exp Cell Res, 1999. **252**(2): p. 342-51.
77. Spicer, A.P. and T.K. Nguyen, *Mammalian hyaluronan synthases: investigation of functional relationships in vivo*. Biochem Soc Trans, 1999. **27**(2): p. 109-15.
78. de la Motte, C., et al., *Platelet-derived hyaluronidase 2 cleaves hyaluronan into fragments that trigger monocyte-mediated production of proinflammatory cytokines*. Am J Pathol, 2009. **174**(6): p. 2254-64.
79. 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.
80. Jiang, D., et al., *Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1173-9.
81. Glinski, A.v., *Protektiver Effekt einer Hyaluronsäuresynthase (Has)-3 spezifischen Inhibition der Hyaluronsäuresynthese auf die Entwicklung und den Schweregrad der Dextrannatriumsulfat-induzierten Kolitis im Mausmodell*. Universitäts- und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2019.
82. Pullan, R.D., et al., *Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis*. Gut, 1994. **35**(3): p. 353-9.
83. Courth, L.F., et al., *Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(45): p. 14000-5.
84. Wehkamp, J., et al., *Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease*. Mucosal Immunol, 2008. **1 Suppl 1**: p. S67-74.

85. Vivinus-Nebot, M., et al., *Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation*. Gut, 2014. **63**(5): p. 744-52.
86. Kim, Y., et al., *Hyaluronan 35kDa treatment protects mice from Citrobacter rodentium infection and induces epithelial tight junction protein ZO-1 in vivo*. Matrix Biol, 2016.
87. Hill, D.R., et al., *Specific-sized hyaluronan fragments promote expression of human beta-defensin 2 in intestinal epithelium*. J Biol Chem, 2012. **287**(36): p. 30610-24.
88. 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.
89. Yuan, H., et al., *Determination of hyaluronan molecular mass distribution in human breast milk*. Anal Biochem, 2015. **474**: p. 78-88.
90. Feinberg, R.N. and D.C. Beebe, *Hyaluronate in vasculogenesis*. Science, 1983. **220**(4602): p. 1177-9.
91. 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.
92. Fiocchi, C., *Cytokines and animal models: a combined path to inflammatory bowel disease pathogenesis*. Gastroenterology, 1993. **104**(4): p. 1202-5.
93. Binion, D.G., et al., *Enhanced leukocyte binding by intestinal microvascular endothelial cells in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1997. **112**(6): p. 1895-907.
94. Hatoum, O.A., J. Heidemann, and D.G. Binion, *The intestinal microvasculature as a therapeutic target in inflammatory bowel disease*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1072**: p. 78-97.
95. Binion, D.G., et al., *Acquired increase in leucocyte binding by intestinal microvascular endothelium in inflammatory bowel disease*. Lancet, 1998. **352**(9142): p. 1742-6.
96. Binion, D.G., et al., *Deficient iNOS in inflammatory bowel disease intestinal microvascular endothelial cells results in increased leukocyte adhesion*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(9): p. 881-8.
97. Sans, M., et al., *VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis*. Gastroenterology, 1999. **116**(4): p. 874-83.
98. Hulten, L., et al., *Regional intestinal blood flow in ulcerative colitis and Crohn's disease*. Gastroenterology, 1977. **72**(3): p. 388-96.
99. Slevin, M., et al., *Hyaluronan, angiogenesis and malignant disease*. Int J Cancer, 2004. **109**(5): p. 793-4; author reply 795-6.
100. Al-Soudi, A., M.H. Kaaij, and S.W. Tas, *Endothelial cells: From innocent bystanders to active participants in immune responses*. Autoimmun Rev, 2017.
101. Tateishi, S., S. Arima, and K. Futami, *Assessment of blood flow in the small intestine by laser Doppler flowmetry: comparison of healthy small intestine and small intestine in Crohn's disease*. J Gastroenterol, 1997. **32**(4): p. 457-63.
102. Wakefield, A.J., et al., *Granulomatous vasculitis in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1991. **100**(5 Pt 1): p. 1279-87.
103. Funayama, Y., et al., *Remodeling of vascular wall in Crohn's disease*. Dig Dis Sci, 1999. **44**(11): p. 2319-23.
104. Wendling, O., et al., *Efficient temporally-controlled targeted mutagenesis in smooth muscle cells of the adult mouse*. Genesis, 2009. **47**(1): p. 14-8.
105. Xin, H.B., et al., *Smooth muscle expression of Cre recombinase and eGFP in transgenic mice*. Physiol Genomics, 2002. **10**(3): p. 211-5.
106. Kucherlapati, M.H., et al., *Inactivation of conditional Rb by Villin-Cre leads to aggressive tumors outside the gastrointestinal tract*. Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3576-83.
107. Feil, R., et al., *Ligand-activated site-specific recombination in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10887-90.



108. Gothert, J.R., et al., *Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium*. *Blood*, 2004. **104**(6): p. 1769-77.
109. Lahat, G., et al., *Immunomodulatory effects of ciprofloxacin in TNBS-induced colitis in mice*. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. **13**(5): p. 557-65.
110. Mahler, M., et al., *Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(3 Pt 1): p. G544-51.
111. Jacobson, A., et al., *Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli*. *Biochem J*, 2000. **348 Pt 1**: p. 29-35.
112. Wang, Y., et al., *Hyaluronan synthase 2 protects skin fibroblasts against apoptosis induced by environmental stress*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(46): p. 32253-65.
113. Wirtz, S. and M.F. Neurath, *Mouse models of inflammatory bowel disease*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007. **59**(11): p. 1073-83.
114. Novak, G., et al., *Histologic scoring indices for evaluation of disease activity in Crohn's disease*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017. **7**: p. Cd012351.
115. 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.
116. Elzey, B.D., et al., *Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments*. *Immunity*, 2003. **19**(1): p. 9-19.
117. Danese, S., L. Motte Cd Cde, and C. Fiocchi, *Platelets in inflammatory bowel disease: clinical, pathogenic, and therapeutic implications*. *Am J Gastroenterol*, 2004. **99**(5): p. 938-45.
118. Morowitz, D.A., L.W. Allen, and J.B. Kirsner, *Thrombocytosis in chronic inflammatory bowel disease*. *Ann Intern Med*, 1968. **68**(5): p. 1013-21.
119. Harries, A.D., et al., *The platelet count as a simple measure to distinguish inflammatory bowel disease from infective diarrhoea*. *J Infect*, 1991. **22**(3): p. 247-50.
120. Harries, A.D., et al., *Platelet count: a simple measure of activity in Crohn's disease*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1983. **286**(6376): p. 1476.
121. Collins, C.E., et al., *Platelets circulate in an activated state in inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(4): p. 840-5.
122. Danese, S., et al., *Platelets trigger a CD40-dependent inflammatory response in the microvasculature of inflammatory bowel disease patients*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(5): p. 1249-64.
123. Petrey, A.C., et al., *Platelet hyaluronidase-2 regulates the early stages of inflammatory disease in colitis*. *Blood*, 2019. **134**(9): p. 765-775.
124. Reitsma, S., et al., *The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization*. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 2007. **454**(3): p. 345-359.
125. Dogné, S. and B. Flamion, *Endothelial glycocalyx impairment in disease: Focus on hyaluronan shedding*. *The American journal of pathology*, 2020: p. S0002-9440(20)30074-2.
126. Lipowsky, H.H., *Role of the Glycocalyx as a Barrier to Leukocyte-Endothelium Adhesion*. *Advances in experimental medicine and biology*, 2018. **1097**: p. 51-68.
127. Cibor, D., et al., *Endothelial dysfunction in inflammatory bowel diseases: Pathogenesis, assessment and implications*. *World journal of gastroenterology*, 2016. **22**(3): p. 1067-1077.
128. Park, S.C. and Y.T. Jeen, *Anti-integrin therapy for inflammatory bowel disease*. *World journal of gastroenterology*, 2018. **24**(17): p. 1868-1880.
129. Eichele, D.D. and K.K. Kharbanda, *Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis*. *World J Gastroenterol*, 2017. **23**(33): p. 6016-6029.
130. 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.

131. Mestas, J. and C.C.W. Hughes, *Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(5): p. 2731-2738.
132. Allocca, M., et al., *Anti-IL-6 treatment for inflammatory bowel diseases: next cytokine, next target*. Curr Drug Targets, 2013. **14**(12): p. 1508-21.
133. Mizoguchi, E., et al., *Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 134-44.
134. Ringerike, T., et al., *NIPH Systematic Reviews: Executive Summaries, in TNFalpha-Inhibitors in Inflammatory Bowel Disease*. 2008, Knowledge Centre for the Health Services at The Norwegian Institute of Public Health (NIPH) Copyright (c)2008 by The Norwegian Institute of Public Health (NIPH). Oslo, Norway.
135. LaPointe, L.C., et al., *Discovery and validation of molecular biomarkers for colorectal adenomas and cancer with application to blood testing*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29059.
136. Slevin, M., et al., *Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways*. Matrix Biol, 2007. **26**(1): p. 58-68.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Maria Grandoch für die ausgezeichnete Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Zudem möchte ich mich bei meinen Kolleginnen Yanina Ostendorf, Christina Kohlmorgen, Nina Pasch und Annika Zimmermann bedanken, die mich in die Welt der experimentellen Arbeiten eingeführt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für den Zugang zu meiner Arbeit und die finanzielle Unterstützung danke ich dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Universität Düsseldorf.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Mann Jens Rimpler und meiner Freundin Tanja Kubas bedanken, die mich bei der Durchsicht meiner Doktorarbeit mit produktiven Anregungen unterstützt haben. Bei dieser Gelegenheit muss ich zudem meinem Bruder Dustin Simone meinen Dank aussprechen, der mich bei der Einarbeitung in die (bio-)chemischen Grundlagen der Hyaluronsäure unterstützt hat. Zudem möchte ich mich bei meiner Freundin Stefanie Löhnes bedanken, die mich auf das Thema der Arbeit aufmerksam machte.

Meinen Eltern und Freunden danke ich für ihre Ermutigungen und Ihre Geduld während des Studiums und der Erstellung dieser Dissertation.