

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der  
Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von  
Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Angefertigt in der Medizinischen Poliklinik der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Herr Prof. Dr. Hans-Joachim Anders)

Die regulatorische Funktion der Hyaluronsäure  
- eine Studie mit primären Mesangialzellen

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München von**

**Rainer Ebid**

**aus München**

**München 2012**

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Sinowatz

1. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Sutter

2. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
1 Einleitung	1
2 Schrifttum	2
2.1 Die Hyaluronsäure	2
2.1.1 Synthese und Degradation der Hyaluronsäure	2
2.1.2 Rezeptoren der Hyaluronsäure	4
2.1.3 Funktion der Hyaluronsäure	5
2.1.4 Klinische Anwendung	9
2.1 Die Mesangialzelle	9
2.3 Hyaluronsäure und Niere	10
2.4 Toll-like-Rezeptoren (TLR)	11
2.5 Interleukine	12
3 Material und Methoden	14
3.1 Material	14
3.1.1 Untersuchungsmaterial	14
3.1.2 Material für die Zellkultur	14
3.2 Methoden	17
3.2.1 Zellkultur	17
3.2.2 Herstellung der Lösungen zur Stimulation	18
3.2.3 Stimulation	19
3.2.4 Auswertung der Versuche	19
3.2.4.1 Prinzip	19
3.2.4.2 Apparative Hilfsmittel	21
3.2.5 Untersuchung der Hyaluronsäure in einem Versuchsaufbau ohne Zellen	21
3.3 Statistische Auswertung	24
4 Ergebnisse	25
4.1 Verzeichnis der im Abschnitt „Ergebnisse“ verwendeten Abkürzungen	25
4.2 Untersuchungsergebnisse	26
4.2.1 Stimulation mit Hyaluronsäure < 3000Da	26
4.2.2 Die Wirkung von Hyaluronidase	33
4.2.3 Der Einfluss von Heparinen	44

4.2.4	Stimulation mit Flagellin	47
4.2.5	Stimulation mit Poly(I:C)	50
4.2.6	Der Einfluss von FeSO <sub>4</sub> und EDTA	52
5	Diskussion	59
6	Zusammenfassung	67
7	Summary	70
8	Literaturverzeichnis	73
9	Verzeichnis der Tabellen	90
10	Abbildungsverzeichnis	92
11	Abkürzungsverzeichnis	95
	Anhang	98
	Danksagung	122

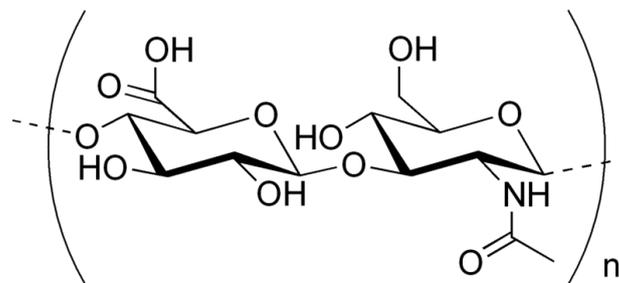
## **1 Einleitung**

1934 publizierten Karl Meyer und John W. Palmer im Journal of Biological Chemistry die Isolierung der Hyaluronsäure. Seitdem hat es eine Flut von Publikationen gegeben, welche sich mit den physikalischen, chemischen und physiologischen sowie den pathophysiologischen Eigenschaften des Moleküls befasst haben. Übersichtsartikel u.a. von Stern et al. (2006) und Jiang et al. (2011), fassten die biologische Wirkung und Bedeutung der Hyaluronsäure nach dem Kenntnisstand zum jeweiligen Zeitpunkt zusammen, waren aber letzten Endes nicht konklusiv. Ein nicht unwichtiger Faktor zur Interpretation der Ergebnisse ist die Problematik einer möglichen Verunreinigung der Hyaluronsäure mit Endotoxin (Lipopolysacchariden, LPS; Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien), einem Liganden des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4). Eine der offenen Fragen, ob die Hyaluronsäure ein Ligand des Toll-like-Rezeptors 2 (TLR2) (Scheibner et al., 2006), des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4) (Termeer et al., 2002) oder beider Rezeptoren (Jiang et al., 2011) ist, war der Ausgangspunkt für die vorliegende Untersuchung.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Die Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (Hyaluronan, HA) ist aus phylogenetischer Sicht ein sehr altes und in seiner Struktur vollständig konserviertes Molekül, welches bereits auf der Evolutionsstufe grampositiver Bakterien als Bestandteil der Zellkapsel von Streptokokken A durch Sugahara et al. (1979) beschrieben wurde. Hyaluronsäure stellt einen Vertreter aus der Gruppe der Glykosaminoglykane (GAG), einem Bestandteil der extrazellulären Matrix, dar, deren weitere Vertreter Dermatan sulfat und Chondroitin sulfat sowie Heparan sulfat/Heparane sind. Im Unterschied zu den anderen Glykosaminoglykanen ist Hyaluronsäure nicht sulfatiert und wird nicht im endoplasmatischen Retikulum, sondern an der Innenseite der Zellmembran polymerisiert (Prehm, 1984). Hyaluronsäure ist aus den Bausteinen N-Acetyl-D-Glucosamin und D-Glucuronsäure aufgebaut, welche durch  $\beta$ -glykosidische Bindungen (Jiang et al., 2011) linearkettig (unverzweigt) verknüpft sind (Atkins et al., 1972). Das Molekül stellt ein Polyanion dar und weist dabei eine höhere Ladungsdichte auf als Heparin oder Chondroitin sulfat (Forrester und Balazs, 1980). Hyaluronsäure findet sich in allen Geweben und Körperflüssigkeiten von Vertebraten und kommt bei einigen Bakterienspezies vor (Fraser et al., 1997).



**Abb. 1** Disaccharid -Wiederholungseinheit der Hyaluronsäure (-4GlcUA $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-)<sub>n</sub> [nach Edgar181]

#### 2.1.1 Synthese und Degradation der Hyaluronsäure

Bekannt sind 3 Hyaluronsäuresynthetasen (HAS1, HAS2 und HAS3) (Itano et al., 1999), welche an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert sind (Prehm, 1984; Philipson et al., 1984; Itano et al., 1999). Die höchste enzymatische Aktivität während der Embryonalentwicklung, untersucht an Mäusen, weist HAS2 auf, wobei die homozygote Deletion der HAS2 (HAS2<sup>-/-</sup>) embryonal letal ist (Camenisch et al. 2000), während Knockout-Mäuse mit homozygoter Deletion von HAS1 oder HAS3 (HAS1<sup>-/-</sup> und HAS3<sup>-/-</sup>) lebensfähig und fertil sind. Der Zell-Mantel aus

Hyaluronsäure, welche durch HAS1 gebildet wird, ist signifikant kleiner als der durch HAS2 und HAS3 gebildete. Dabei werden von HAS1 und HAS3 Moleküle in der Größenordnung von  $2 \times 10^5$  bis  $2 \times 10^6$  Da (Iton) synthetisiert, während HAS2 Moleküle im Größenbereich von durchschnittlich über  $2 \times 10^6$  Da bildet (Itano et al., 1999). Das Hyaluronsäure-Molekül wird direkt durch die Zellmembran aus der Zelle ausgeschleust (Prehm, 1984), während dies bei den anderen GAG-Molekülen via Exozytose erfolgt (Kreiner et al., 1990). Pienemäki et al. (2001) fanden im Keratinozytenmodell, dass durch EGF (epidermal growth factor, epidermaler Wachstumsfaktor) eine Transkriptionserhöhung von HAS2 im Vergleich zu HAS1 und HAS3 stattfand.

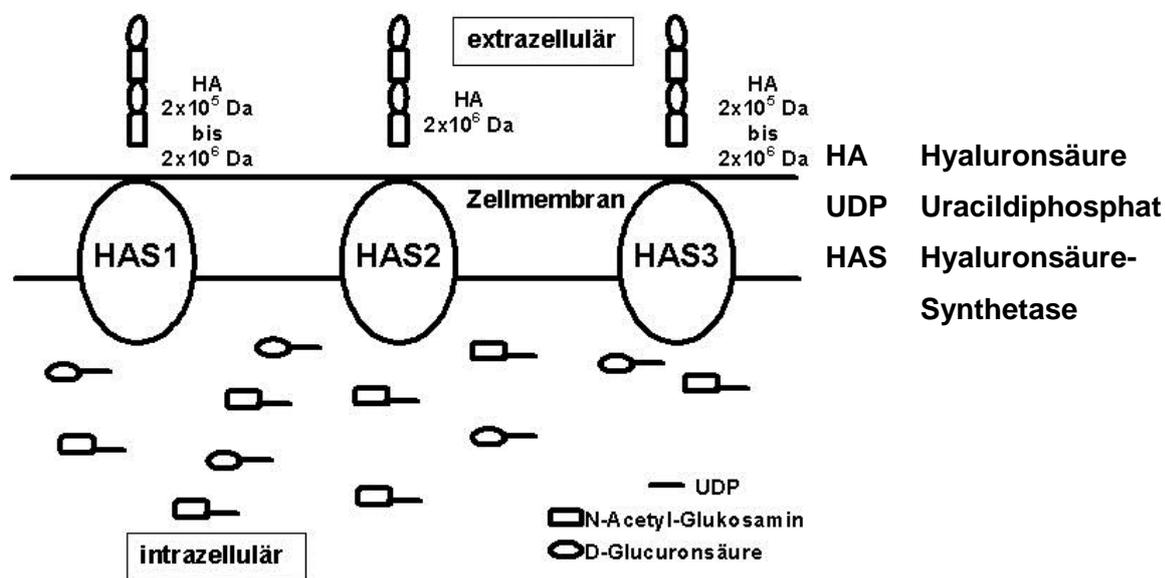


Abb. 2 Hyaluronsäuresynthese

Für die Spaltung der Hyaluronsäure sind zwei unterschiedliche Wege bekannt, zum einen die Spaltung durch Radikale, besonders Sauerstoff-Radikale und Hydrogen-Radikale (McNeil, 1989), zum anderen durch Hyaluronidasen. Dabei ändert sich die Viskosität (Soltés et al., 2007 b), wobei Hyaluronsäure höherer Molekülmasse eine höhere Viskosität der Hyaluronsäurelösung bedingt. Bekannt sind Hyaluronidasen tierischen und bakteriellen Ursprungs, wobei auch Organismen ohne Hyaluronsäure Hyaluronidase bilden (Hänsel et al., 2010). Beschrieben sind Hyaluronidasen auch als Bestandteile von Bienengiften und Schlangengiften sowie im Speichel von Stechmücken und Blutegeln (Hänsel et al., 2010) und im Gift von Skorpionen (Wright et al., 1977). Angemerkt sei an dieser Stelle, dass Hyaluronidase als Zusatz in

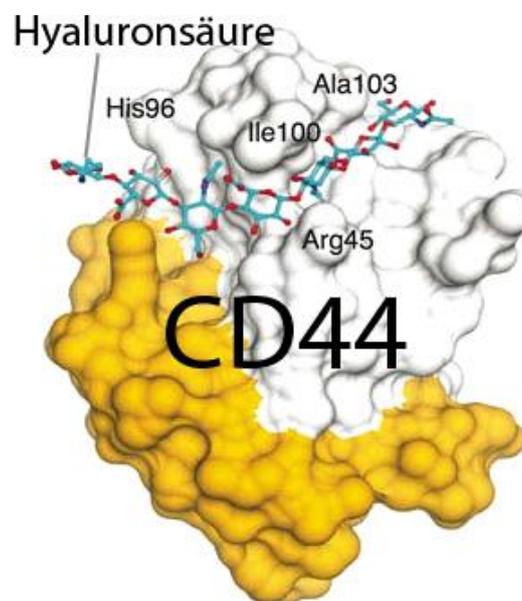
Narkosepfeilen beim „Darten“ von Großtieren Anwendung findet, um einen schnelleren Eintritt der Wirkung des Narkosemittels zu bewerkstelligen.

Der Abbau der Hyaluronsäure durch Hyaluronidase (HYAL) tierischen Ursprungs erfolgt bis zur Größe von Tetrameren (Hänsel et al., 2010), wobei HYAL1 intralysosomal (Triggs-Raine et al., 1999), im Plasma (Fischer-Szafarz et al., 2000) sowie im Urin (Csóka et al., 2001) lokalisiert ist, während HYAL2 intralysosomal (Triggs-Raine et al., 1999, Fischer-Szafarz et al., 2000) und PH-20 in Spermien (Fischer-Szafarz et al., 2000) vorkommt. Gemäß Csóka et al. (1999) werden HYAL1, HYAL2 und HYALP1 in vielen Bereichen des Körpers gebildet, während HYAL3 auf Knochenmark und Hoden, HYAL4 auf Plazenta und Skelettmuskel und SPAM1 (PH-20) auf den Hoden beschränkt ist. Bei Säugetieren sind HYAL1 und HYAL2 die Hyaluronidasen mit der größten Aktivität im Gewebe des Körpers (Csóka et al., 2001). Der Abbau von Hyaluronsäure durch diese Enzyme erfolgt im Zusammenspiel von HYAL1 und HYAL2 bis zur Stufe von Tetrameren (Csóka et al., 2001), wobei der Abbau von 20kDa-Fragmenten an der Zelloberfläche durch HYAL2 und der weitere Abbau zu Tetrameren intralysosomal durch HYAL1 erfolgt. Kim et al. (2005) identifizierten eine weitere Hyaluronidase (HYAL5). Diese Hyaluronidase ist im Hoden der Maus lokalisiert und dient ausschließlich der Penetration des Cumulus oophorus. Chain et al. (1939) identifizierten Hyaluronidase, gewonnen aus Rinderhoden, als das Äquivalent des 1928 von Duran-Reynolds beschriebenen spreading factors (Christensen, 1939). Bakterielle Hyaluronidase, die auch als spreading factor der Streptokokken dient (Habermann, 1960), baut Hyaluronsäure durch Abspaltung von Dimeren ab (Hänsel et al., 2010). Allen et al. (2004) wiesen nach, dass *Streptococcus suis* Hyaluronsäure nicht nur abbaut, sondern als Energiequelle nutzt. Die Hyaluronidase-Aktivität im Plasma von Nacktmäusen lag in der Untersuchung von Maingonnat et al. (2003) bei 310mU/l bis 520mU/l.

### **2.1.2 Rezeptoren der Hyaluronsäure**

Jiang et al. (2011) bezeichneten in ihrem Übersichtsartikel die Toll-like-Rezeptoren TLR2 und TLR4 als Rezeptoren der Hyaluronsäure. Als weitere Rezeptoren wurden CD44, LYVE-1, ein Homologon des CD44-Rezeptors (Banerji et al., 1999), TSG-6 (tumor necrosis factor-inducible protein-6; Lee et al., 1992), Versican, Brevican, Neurocan und HARE (human receptor for endocytosis) genannt. RHAMM (receptor for hyaluronan mediated motility) wurde von Turley 1992 als extrazellulärer Rezeptor

vorgestellt und von Lynn et al. (2001) intrazellulär und in isolierten Mitochondrien nachgewiesen. Der Hauptrezeptor für Hyaluronsäure an der Zelloberfläche ist CD44 (Lesley et al., 1997). HARE ist für die Endozytose von Hyaluronsäurefragmenten (Harris et al., 2007) sowie Heparin (Harris et al., 2008) verantwortlich. Einige Hyaluronsäure-bindende Moleküle (RHAMM, ITI, SPACR, SPACRCAN, CD38, CDC37, HABP1/P-32 [hyaluronan binding protein], und IHABP4 [intracellular hyaluronan binding protein]) haben kein „Verknüpfungsmodul“ und können die Hyaluronsäure somit nirgendwo fixieren (Hascall et al., 2009).



**Abb. 3** Bindung der Hyaluronsäure an CD44 der Maus [modifiziert nach Banerji et al., 2007]

### 2.1.3 Funktion der Hyaluronsäure

Rilla et al. (2008) visualisierten zum einen, dass Hyaluronsäure die Zelle wie ein Mantel umgibt und zum anderen den Abbau dieses „Hyaluronsäure-Mantels“ durch Hyaluronidase. Hyaluronsäuremoleküle sind in der Lage Wasser in einem Verhältnis von 1:1000 zu binden, was bei hochmolekularer Hyaluronsäure (Hyaluronan of high molecular weight; HMW-HA), also einer Molekülmasse von  $4 \times 10^5$  -  $2 \times 10^7$  Da (Iton) (Stern et al., 2006) zu einer gelartigen Konsistenz führt. Bei geringerer Molekülgröße vermindert sich auch die Viskosität des Hyaluronsäure-Wasser-Komplexes (Soltés et al., 2007, b). Für Hyaluronsäure sind als Rezeptoren an der Zelloberfläche CD44, Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) und Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) bekannt (Termeer et al., 2002; Jiang et al., 2011), wobei entsprechend den Untersuchungen von Scheibner et al. (2006) TLR4 als Rezeptor strittig ist und die Identifikation als

Hyaluronsäurerezeptor auf eine Verunreinigung der Testsubstanz mit Lipopolysacchariden zurückgeführt wird. An der Zelloberfläche bildet sich ein visköser Film. Versikan bindet sich über das „link protein“ an die HA-Stränge, wodurch ein perizellulärer Mantel entsteht, welcher die Zelle wie eine Hülle umschließt (Rilla et al., 2008). Bei Bakterien wurde die Hyaluronsäure als Schutz der Zelle vor Phagozytose beschrieben (Forrester et al., 1980). Hyaluronsäure kommt ubiquitär im Organismus vor (Scheibner et al., 2006). So ist die Hyaluronsäure Bestandteil des Glaskörpers im Auge (Meyer et al., 1934) sowie der Synovialflüssigkeit (Ragan et al., 1949). Zudem ist sie für den thixotropen Effekt in der Muskulatur (Wiegner, 1987) verantwortlich. [Anmerkung: Thixotropie bezeichnet in der Rheologie eine Zeitabhängigkeit der Fließeigenschaften bei nichtnewtonschen Fluiden, bei der die Viskosität (Zähflüssigkeit) infolge andauernder mechanischer Beanspruchung abnimmt und erst nach beendigter Beanspruchung wieder zunimmt. DIN 1342-3:2003-11, Kap. 4.2.3, Pkt. a)]

Hyaluronsäure ist ein Bestandteil von Sekreten (Fraser et al., 1997). So visualisierten Tammi et al. (1994) die Hyaluronsäure als Bestandteil der Spermaflüssigkeit mittels bHABC (biotinylated hyaluronan binding complex), eines hyaluronsäurebindenden Komplexes, isoliert aus Gelenkknorpel. Zudem ist die Hyaluronsäure Bestandteil des Speichels und verleiht diesem die Viskosität (Park et al., 2010). Intrazellulär wurden in allen Kompartimenten der Zelle Hyaluronsäurerezeptoren beschrieben, so dass das Molekül über die Wasserbindungskapazität vermutlich eine zentrale Rolle bei der Erhaltung des Zellurgors besitzt. RHAMM (receptor of hyaluronan mediated motility) kommt in der Zellmembran, im Zytoplasma und im Zellkern vor (Lynn et al., 2001).

Diesem Konzept der endogenen Aufrechterhaltung des Zellvolumens steht das Konzept im Pflanzenreich gegenüber. Bei Pflanzen ist keine Hyaluronsäure beschrieben, jedoch als Exoskelett die Zellulose, welche im Tierreich fehlt. Die Struktur der Zellulose als phylogenetisch altes Molekül (lineare Struktur, Verknüpfung der Glukosemoleküle via  $\beta$ -1,4-glykosidischer Bindung) ist ebenso einfach wie die der Hyaluronsäure. Ein weiteres vergleichbares Strukturmolekül stellt das Chitin dar, welches u.a. bei Insekten und Krebsen vorkommt und ein Polymer des N-Acetyl-D-glukosamins (durch  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen verknüpft) darstellt (Merzendorfer et al., 2003). Zudem spielt Chitin im Reich der Pilze eine Rolle (Blumenthal et al., 1957).

**Tabelle 1: Zellulose – Hyaluronsäure - Chitin**

<b>Struktur</b>	<b>Baustein</b>	<b>Vorkommen</b>
Zellulose	Glucose	Zellwand von Pflanzen
Hyaluronsäure	Dimer aus N-Acetyl-Glukosamin und D-Glucuronsäure	Extra- und intrazellulär im Tierreich
Chitin	N-Acetyl-Glukosamin	Insekten, Krebse (Exoskelett) und Pilze

Über die Bedeutung als strukturelles Molekül hinaus sind für Hyaluronsäure viele Aufgaben als funktionelles Molekül beschrieben, auch unter Berücksichtigung der Molekülgröße. Hyaluronsäure spielt eine Rolle bei der Zellbewegung (Turley, 1992). In Verbindung mit dem CD44-Rezeptor an der Zelloberfläche beschrieben Bretschner (1999) sowie Oliferenko et al. (2000), wie über die GTP-asen RhoA und Rac1 der Aufbau und die Funktion des Zytoskeletts gesteuert werden. Kamikura et al. (2000) beschrieben einen Phosphoinositol-3-Kinase-Aktivitäts-abhängigen Signalweg, welcher zelluläre Prozesse Proliferation und Apoptose reguliert. In der Arbeit wurde eine die positive Korrelation zwischen Phosphoinositol-3-Kinase-Aktivität und Hyaluronsäure-Synthese festgestellt und auf die Bedeutung der Überexpression von Hyaluronsäure und CD44 bei der Onkogenese hingewiesen.

Der Schutz vor Phagozytose (Forrester und Balazs, 1980) ist ähnlich wie andere protektive Effekte der HMW-HA (Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von ca.  $4 \times 10^5$ -  $2 \times 10^7$ Da; Stern et al., 2006) zuzuschreiben. Stern et al. (2006) fassten die Eigenschaften unterschiedlich großer Hyaluronsäuremoleküle zusammen. Sie reichen von der Unterdrückung der Angiogenese, Phagozytose und Hyaluronsäureproduktion sowie der Immunsuppression bei HMW-HA (> 1000 - 5000 Saccharideinheiten) über die Stimulation und Suppression unterschiedlicher Zytokine und Enzyme und die Spaltung von CD44 sowie einen stimulierenden Einfluss auf die Tumorzellmigration bei LMW-HA (Hyaluronsäure mit einer Größe unter 1000 Saccharideinheiten) bis hin zur Chemotaxis und Apoptoseunterdrückung in einer Größenordnung von vier Saccharideinheiten. Die Tatsache, dass Hyaluronsäure durch Radikale gespalten werden kann (McNeil et al., 1989) bedeutet, dass sie funktionell ein Radikalfänger ist (Laurent et al., 1996).

**Tabelle 2: Funktionen der Hyaluronsäure [modifiziert nach Stern et al., 2006]**

<b>Molekülmasse der Hyaluronsäure</b>	<b>Funktion der Hyaluronsäure</b>
ca. 200kDa bis 1000kDa	<ul style="list-style-type: none"><li>-Unterdrückung der Angiogenese</li><li>-Immunsuppression</li><li>-Inhibierung der Phagozytose</li></ul>
ca. 200kDa	<ul style="list-style-type: none"><li>-Unterdrückung der Hyaluronsäure- Synthese</li><li>-Induktion inflammatischer Chemokine</li><li>-Stimulation von Plasmin-Aktivator-Inhibitor I</li><li>-Stimulation der Urokinase</li></ul>
ca. 2kDa bis 8 kDa	<ul style="list-style-type: none"><li>-Induktion der Spaltung von CD44</li><li>-Förderung der Migration von Tumorzellen</li></ul>
ca. 1,6 bis 6,4 kDa	<ul style="list-style-type: none"><li>-Stimulation der Angiogenese</li><li>-Stimulation der Tumor-Neovaskularisation</li></ul>
ca. 3kDa	<ul style="list-style-type: none"><li>-Unterdrückung der Proliferation glatter Muskelzellen</li></ul>
ca. 2,4kDa	<ul style="list-style-type: none"><li>-Differenzierung von Endothelzellen</li><li>-Hochregulation von PTEN (Phosphatase und Tensin-Homologon, ein Protein) in Tumorzellen</li></ul>
ca. 2kDa	<ul style="list-style-type: none"><li>-Verschiebung von Matrix-Hyaluronsäure auf Oozyten</li><li>-Verschiebung von Proteoglykanen von der Zelloberfläche</li></ul>
ca. 1200Da	<ul style="list-style-type: none"><li>-Unterdrückung der Kettenbildung von Hyaluronsäure</li><li>-Induktion von Stickstoffmonoxyd und Matrix-Metallo-Proteinasen in Chondrozyten</li><li>-Induktion von HAS2 in Chondrozyten</li></ul>
ca. 800Da bis 1200Da	<ul style="list-style-type: none"><li>-Induktion der Zytokinsynthese in dendritischen Zellen</li></ul>
ca. 800Da	<ul style="list-style-type: none"><li>-Transkription von Matrix-Metallo-Proteinasen</li><li>-Hochregulation des Heat-Shock-Proteins HSP72</li><li>-Unterdrückung der Apoptose</li><li>-Induktion von Chemotaxis</li><li>-Hochregulation des Heat-Shock-Faktors-1</li><li>-Hochregulation der FAS (Apoptose-antigen 1)-Expression</li><li>-Unterdrückung der Proteoglykan-Sulfatierung</li></ul>

Zusammenfassend kann somit das Hyaluronsäure-Molekül als zellprotektiv bezeichnet werden, welches dem Prozess der Apoptose als Abwehrmechanismus, im Sinne der Organismusprotektion, gegenübersteht. Apoptose ist als Abwehrmechanismus unter anderem bei DNA-Schäden und Virusbefall der Zelle bekannt. Als Zytoprotektivum wurde Hyaluronsäure für die Epithelzellen der Oberfläche am Auge beschrieben (Debbasch et al., 2002). Während der antiapoptotische Effekt günstig für den Erhalt von postmitotischen Zellen ist, stellt er ein Problem im Tumorgeschehen dar. Dies zeigt sich in der Arbeit von Anderegg et al. (2009). Durch Herstellung und Verwendung von löslichen sCD44-Molekülen, welche mit den membranständigen mCD44 um die HA-Moleküle konkurrierten, und

somit die Hyaluronsäure von der Zelloberfläche „wegfangen“ konnten, konnte Apoptose induziert werden. Die Apoptose vollzog sich somit nach Entfernung der Hyaluronsäure.

Ein schneller Anstieg von Hyaluronsäure im Blut wurde bei Schock und Sepsis (Berg et al., 1988; Berg 1997), Verwundung, Verbrennungen und starken Blutverlusten (Onarheim et al., 1991; Ferrara et al., 1991) beschrieben. Bei einer Serum-Konzentration von unter  $[100\mu\text{g/ml}]$ , im Mittel  $[30\mu\text{g/ml}]$  bis  $[40\mu\text{g/ml}]$ , beträgt die Halbwertszeit, durch effektive Elimination der Hyaluronsäure hoher Molekülmasse in der Leber, 2 bis 5 Minuten im Serum (Laurent, 1987), bzw. im Plasma (Kaplan et al., 1962).

#### **2.1.4 Klinische Anwendung**

Hyaluronsäure hoher Molekülmasse wird topisch u.a. bei Augenoperationen (Goldman et al., 2007) und zur intraartikulären Injektion (Reichenbach et al., 2007) eingesetzt. In der Veterinärmedizin existiert eine Formulierung zur intravenösen Anwendung der Hyaluronsäure. Bei Pferden wurde nach intravenöser Hyaluronsäuregabe eine Reduktion der Lahmheitssymptomatik beschrieben (Kawcak et al., 1997). Ein objektivierbares Korrelat zur Besserung der klinischen Symptomatik konnte nicht gefunden werden. Gannon (1998) beschrieb die intravenöse Anwendung bei Windhunden. Darüber hinaus wird Hyaluronsäure in der ästhetischen Medizin (Tezel et al., 2008) angewandt.

## **2.2 Die Mesangialzelle**

Mesangialzellen sind im Bereich der Kapillarschlingen der Glomerula der Niere lokalisiert (intraglomeruläre Mesangialzellen). Darüber hinaus finden sie sich im extraglomerulären Gefäßbereich am vaskulären Pol des Glomerulum (extraglomeruläre Mesangialzellen). Sie haben die Charakteristiken einer glatten Muskelzelle (Schlöndorff, 1987) und stellen einen mikrovaskulären Perizyten dar (Schlöndorff et al., 2009). Zusammen mit glomerulären Endothelzellen und Podozyten bilden Mesangialzellen eine funktionelle Einheit. Über ihre Kontraktilität beeinflussen Mesangialzellen die lokale glomeruläre Filtrationsrate und tragen zur Regulation des kapillären Blutflusses der Glomerula und zur glomerulären Filtration bei. Zudem wirken Mesangialzellen als unterstützende Struktur der Kapillarschlingen und generieren und kontrollieren die Erneuerung der mesangialen Matrix. Sie stellen

zudem eine Zielstruktur von Wachstumsfaktoren dar (Schlöndorff et al., 2009). Mesangialzellen können proangiogenetische Faktoren ausschütten (Boor et al., 2010) und haben ein regeneratives Potential. So ging die Arbeitsgruppe von Bruno et al. (2009) auf Grund Ihrer Untersuchung davon aus, dass zumindest eine Population multipotenter mesenchymaler Zellen in den Glomerula existiert, welche dem physiologischen Zellersatz im Rahmen des Zellturnover oder als Antwort auf eine glomeruläre Schädigung dient. Mesangialzellen können den Phänotyp von Myofibroblasten annehmen und dieselben Matrixproteine produzieren (Barnes et al., 2011). Auch eine Makrophagenfunktion wurde bei Mesangialzellen nachgewiesen. Darüber hinaus haben Mesangialzellen eine sekretorische Funktion, produzieren Wachstumsfaktoren und Matrixproteine, die sowohl bei der Entwicklung des Glomerulum als auch bei pathologischen Prozessen eine Rolle spielen (Ghayur et al., 2008), speziell im Rahmen der Pathophysiologie einer Reihe glomerulärer Erkrankungen bei (Schlöndorff et al., 2009). In diesem Zusammenhang sind Fc-Rezeptoren zur Anheftung des Fc-Teils von Antikörpern von Bedeutung. So brachten McDonald et al. (2002) die Expression eines Fc-Rezeptors mit der Genese der IgA-Nephropathie in Zusammenhang. Im extraglomerulären Bereich befindet sich ein Reservoir für Mesangialzellen im Sinne von Vorläuferzellen, welche der Regeneration dienen (Hugo et al., 1997).

### **2.3 Hyaluronsäure und Niere**

Untersuchungen zum Vorkommen von Hyaluronsäure sowie zur Veränderung ihrer Verteilung in der Niere wurden von der Arbeitsgruppe um Hansell und Göranson durchgeführt. So wurde gezeigt, dass bei physiologischen Veränderungen im Sinne unterschiedlicher Osmolaritäten des Harns der Hyaluronsäuregehalt im Markbereich der Niere erfolgte. Ein unterschiedlicher Hydratationsstatus war begleitet von einem unterschiedlichen Anstieg des Hyaluronsäuregehaltes (Hansell et al., 2000). In einer Folgeuntersuchung fand sich bei einem erhöhten Hydratationsstatus trotz erhöhter Hyaluronsäurewerte keine erhöhte Syntheserate für Hyaluronsäuresynthetase (HAS), wobei die HAS2 am stärksten, HAS1 und HAS3 nur schwach exprimiert waren. Es wurde auf eine vermehrte Aktivität zumindest einer HAS geschlossen. Auch die Syntheserate der Hyaluronidasekonzentration (HYAL) veränderte sich nicht, wobei HYAL1-3 stark und HYAL4 schwach exprimiert wurden. Im Urin wurde eine verminderte Aktivität der ausgeschiedenen Hyaluronidase festgestellt. Mit einem

verminderten Hyaluronsäuregehalt war eine verminderte Antidiurese vergesellschaftet (Rügheimer et al., 2009). Generell stieg der Hyaluronsäuregehalt mit steigendem Wassergehalt im Bereich der Medulla, während er die Osmolalität des Urins gleichzeitig abnahm (Hansell et al., 2000). Bei Nierenschädigung, induziert durch zeitlich unterschiedliche Perfusionsunterbrechungen der Niere, stieg mit zunehmender Dauer der Ischämie der Hyaluronsäuregehalt im Cortex der Niere an (Göranson et al., 2004).

Im Zusammenhang mit einer Nephritis beim Lupus erythematodes (Lupusnephritis) zeigte sich eine erhöhte Hyaluronsäureexpression durch die Mesangialzellen der Niere (Yung et al., 2006). Chi et al. (2011) fanden einen Unterschied im Profil der Hyaluronsäuresynthetasen, Hyaluronidasen und Hyaluronsäurerezeptoren zwischen Onkozytomen der Niere, Nierenzellkarzinomen und gesundem Gewebe. So waren die Transkriptionsniveaus (mRNA) von HAS1, CD44 und RHAMM beim Klarzellkarzinom der Niere und bei papillären und chromophoben Tumoren im Mittel auf das drei-fache bis 25-fache gegenüber normalem Gewebe erhöht. Das Transkriptionsniveau von HYAL4 (Hyaluronidase), CD44 und RHAMM war beim Klarzellkarzinom der Niere und bei papillären Tumoren vier- bis 12-mal so hoch wie bei Onkozytomen, während das HYAL4-Transkriptionsniveau zwischen chromophoben Tumoren und Onkozytomen unterschied.

## **2.4 Toll-like-Rezeptoren (TLR)**

Metchnikoff erhielt 1908 den Nobelpreis für die Entdeckung der angeborenen Fähigkeit „Fremdes“ durch ein zellbasiertes Abwehrsystem zu erkennen. 1996 wurde bei der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) ein Transmembranprotein, Toll, entdeckt, welches bei der Erkennung von Pilzen im Rahmen der körpereigenen Abwehr eine Rolle spielt. Bei Mäusen und Menschen wurden die Toll-like Rezeptoren TLR1 bis TLR9 gefunden, wobei TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, während sich TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 intrazellulär befinden. Zudem wurde beim Menschen, nicht jedoch bei Mäusen der TLR10 identifiziert, während bei Mäusen, nicht jedoch beim Menschen, die Rezeptoren TLR11, TLR12 und TLR13 gefunden wurden (Chang, 2010).

**Tabelle 3: Toll-like-Rezeptoren und spezifische Liganden**

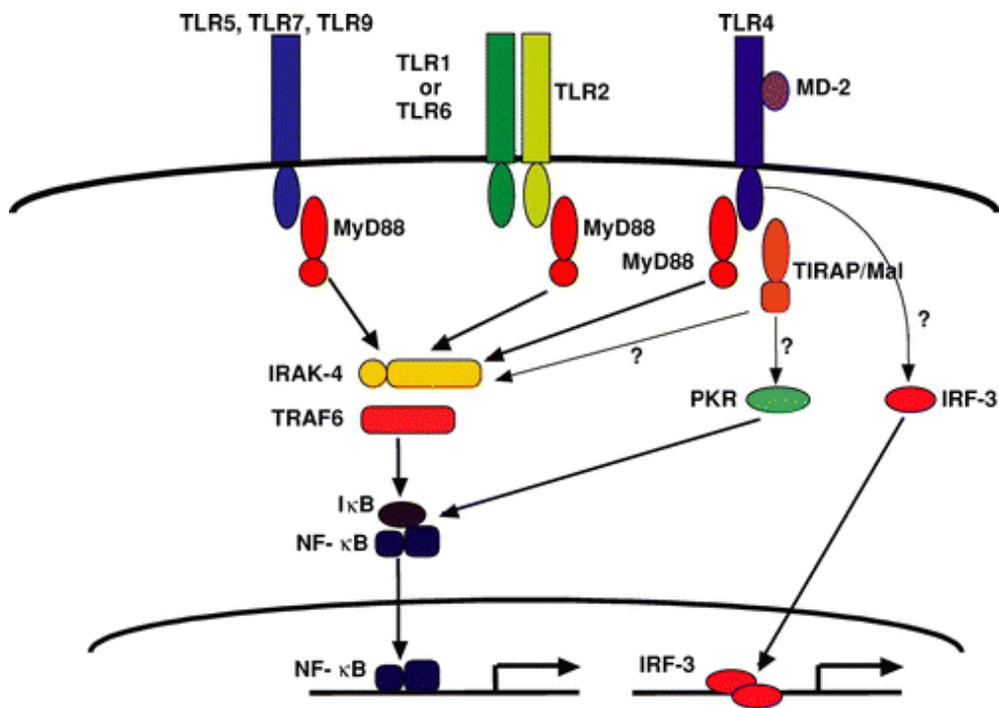
<b>Toll-like-Rezeptor</b>	<b>Ligand</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Referenz</b>
TLR1	Triacyl-Lipopeptide	bildet Heterodimere mit TLR2	Chang (2010)
TLR2	PAM3CysSK4 (synthetisches Lipoprotein)		van Maren et al. (2011)
TLR3	Poly(I:C) (synthetische dsRNA)		Kumar et al. (2006)
TLR4	LPS (Lipopolysaccharid)		Lim et al. (2011)
TLR5	Flagellin		Kwon et al. (2011)
TLR6	Diacyl-Lipopeptide	bildet Heterodimere mit TLR2	Chang (2010)
TLR7	Imidazolquinoline		Chang (2010)
TLR8	ssRNA		Chang (2010)
TLR9	Unmethyliertes CpG (Cytidinphosphat-Guanosin)		Chang (2010)
TLR10	(als Heterodimer) u.a. mykobakterielle Proteine	funktionelles Heterodimer mit TLR1 und TLR2	Fisher et al. (2011)
TLR11	Profilin (Toxoplasma gondii)		Kucera et al. (2010)
TLR12			keine Referenz
TLR13	Vesikuläres Stomatitis Virus		Shi et al. (2011)

In der Tabelle sind Toll-like-Rezeptoren und, soweit bekannt, spezifische Liganden aufgeführt. Bei ungestörter Signalkaskade führt die Stimulation u.a. von TLR2, TLR3, TLR4 und TLR5 zur Produktion von Interleukin IL-6 (Patole et al., 2006).

## 2.5 Interleukine

1980 wurde von Lachman et al. (1980 b) das Interleukin 1 vollständig isoliert, das von derselben Arbeitsgruppe (Lachman et al., 1980 a) kurz vorher noch als „human lymphocyte activating factor“ bezeichnet wurde. Die weiteren Interleukine wurden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert. Interleukine gehören zu den Zytokinen (Gupta, 1988) und dienen der Zellkommunikation. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist das Interleukin-6 (IL-6) von Bedeutung. Interleukin-6 (IL-6, früher BSF2 genannt, Tosato et al., 1988) wurde im Zusammenhang mit den IL-6-

Rezeptoren von Mihara et al. (2012) im Rahmen eines Übersichtsartikels eingehend beschrieben. Die Induktion von IL-6 gehört zur Akut-Phase-Antwort. Die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren, u.a. der Rezeptoren TLR2, TLR3, TLR4 und TLR5 führt bei intakter Signalkaskade zur Produktion von IL-6 (Patole et al., 2006).



**Abb. 4** Signalweg von Toll-like-Rezeptor [nach Takeda et al., 2003]

In der oben stehenden Abbildung der Signalweg zur Bildung von NF- $\kappa$ B illustriert. NF- $\kappa$ B induziert u.a. die Produktion von IL-6, reguliert darüber hinaus jedoch viele Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle, Akut-Phase-Proteine (Ghosh et al., 2002).

In der Literaturübersicht wurde ein Überblick über die unterschiedlichen Aspekte der Hyaluronsäure, sowohl aus physikalischer als auch aus biologischer und chemischer Sicht gegeben. Im Rahmen dieser Arbeit war das biochemische Verhalten der Hyaluronsäure von Interesse. Die Untersuchungsergebnisse bisheriger Studien zum Verhalten der Hyaluronsäure gegenüber Toll-like-Rezeptoren (TLR) waren uneinheitlich, so dass im Rahmen dieser Arbeit diese Problematik aufgegriffen wurde. Zur Untersuchung der Interaktion zwischen Hyaluronsäure und Zelle wurde für diese Arbeit die Mesangialzelle gewählt. Interleukin 6 spielte in der Untersuchung die zentrale Rolle im Nachweissystem.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Untersuchungsmaterial**

Die Untersuchungen wurden an Mesangialzellen in Zellkulturen durchgeführt. Dabei handelte es sich um primäre Mesangialzellen von C57/BL6-Knockout-Mäusen, zum einen mit einem homozygoten Knockout für den Toll-like-Rezeptor 2 (pMC/TLR2-/-), zum anderen um einen homozygoten Knockout für den Toll-like-Rezeptor 4 (pMC/TLR4-/-). Die jeweiligen Rezeptoren fehlten somit vollständig in den jeweiligen Zellen. Die Zellen waren zu einem früheren Zeitpunkt im Labor isoliert und in flüssigem Stickstoff konserviert worden und wurden für die Untersuchung zur Verfügung gestellt.

Für einen Versuchsaufbau in einer Eppendorfküvette wurde als Substrat Hyaluronsäure hoher Molekülmasse (HyGAG 2ml-Fertigspritze – 20mg -, Fa. Curasan AG, Kleinostheim, Deutschland) verwendet. Dieser Versuch wurde ohne Zellen durchgeführt.

##### **3.1.2 Material für die Zellkultur**

Nährmedium:

DMEM + GlutaMAX – I®	Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland, Katalog-Nr. 21885-108
FBS Superior (fetales bovines Serum)	Fa. Biochrom AG, Berlin, Deutschland, Katalog-Nr. S 0615
Penicillin/Streptomycin-Lösung (P/S);	Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich, Katalog-Nr. P11-010
[Nährlösung: DMEM + GlutaMAX – I + 10% fetales bovines Serum + 1% P/S]	
DPBS-Lösung	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach, Deutschland, Katalog- Nr. P04-36500 (Waschen der Zellen)
Trypsin-EDTA-Lösung	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach, Deutschland, Katalog- Nr. P10-023100
RPMI 1640 + GlutaMAX-I®	Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland, Katalog-Nr. 61870-040

Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Fa. TPP-Technologie Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten mit 6 bis 96 Kalotten (6 bis 96 well plates)	Fa. TPP-Technologie Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland; 5ml Katalog Nr. 606180, 10ml Katalog Nr. 607180; 20ml Katalog Nr. 760107
Pipettierhilfen	Eppendorf Easypet; Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikropipettenspitzen	Josef Peske GmbH&CO KG, Aindlingen-Arnhofen, Deutschland; bis 10µl 2121-10L Katalog-Nr.1002-10L, bis 1000µl Katalog-Nr.1001-10L
Pipetten	Pipetman 2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl; Fa. Gilson, Inc., Middleton, USA
Multikanalpipette (8 Kanäle 30-300µl)	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; Katalog-Nr. 3114000.158
Zentrifugenröhrchen (Falcon™) (15ml und 50ml)	Fa. Genaxxon BioScience GmbH, Ulm, Deutschland; Katalog-Nr. I2202.0750 und I2200.0600
Eppendorfcuvetten (1,5ml, 2ml)	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellkultur-Arbeitsplatz	ASTEC Microflow Class II Cabinet – Bioquell UK-Ltd., Hampshire SP10 3TS, Großbritannien
Inkubator:	HeraCell 150®, Heraeus; Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA 02454, USA; Einstellung: 37°C, 5% CO <sub>2</sub>
Zellstimulation:	
Lipopolysaccharide (LPS)	Fa. InvivoGen, San Diego, California 92121, USA; LPS-EB Ultrapure Cat.# tlr1-pelps
Pam3CysSK4 (synthetisch)	Fa. InvivoGen, San Diego, California 92121, USA; Pam3CSK4 Cat.# tlr1-pms

Poly(I:C) (synthetisches Analogon der dsRNA)	Fa. InvivoGen, San Diego, California 92121, USA; Poly(I:C) Cat.# tlr-pic-5
Flagellin (rekombinant)	Fa. InvivoGen, San Diego, California 92121, USA; FLA-ST Ultrapure Cat.# tlr-flic-10
Aqua ad iniectabilia 50ml	Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
NaCl 0,9% isoton 50ml	Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Hyaluronsäure <1500Da endotoxinfrei	Fa. Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland; Katalog-Nr. ALX-580-004-C250
Hyaluronsäure 1500Da – 3000 Da endotoxinfrei	Fa. Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland; Katalog-Nr. ALX-580-005-C250
Hyaluronidase (boviner Testis) (750 – 1500 U/mg)	Fa. Sigma (Sigma-Aldrich), Taufkirchen, Deutschland; Katalog-Nr. H 4272
M2-Medium	Fa. Sigma (Sigma-Aldrich), Taufkirchen, Deutschland; Katalog-Nr. M 7167
[Anmerkung: Lösung der Hyaluronidase in M2.]	
Heparin-Natrium 5000 I.E./0,2ml Ampullen	Fa. ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Clexane (Enoxaparin) 40mg in 0,4ml Fertigspritzen	Fa. Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, Deutschland
Ascorbinsäure	Fa. Sigma (Sigma-Aldrich), Taufkirchen, Deutschland; Katalog-Nr. A 4403
Polymyxin B	Fa. Sigma (Sigma-Aldrich), Taufkirchen, Deutschland; Katalog-Nr. P 4932
K-EDTA-Monovette 2,7ml (1,6mg EDTA/ml Blut)	Fa. Sarstedt AG, Wiehl, Deutschland; Katalog-Nr. 05.1167

[Anmerkung: Zur Gewinnung sterilen EDTAs wurde die Monovette mit NaCl 0,9% aufgefüllt. Die entstandene Kalium-Natrium-Mischung, ist weniger ungünstig für die externe Anwendung an Zellen als eine reine Kalium-Lösung.]

Eisen(II)sulfat-Heptahydrat

Fa. Sigma (Sigma-Aldrich), Taufkirchen,  
Deutschland; Katalog-Nr. F8633-250G.

[Anmerkung: Herstellung einer Stammlösung 200mg/ml mit Aqua ad iniectabilia.]

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Die Zellzüchtung erfolgte in Zellkulturflaschen (75cm<sup>2</sup>)

Durchführung der Zellpassagen mit Zellteilung (Splitten der Zellen):

1. Entnahme des Nährmediums,
2. Waschen der Zellen mit 10ml DPBS, Entfernung des DPBS,
3. Zugabe von 2,5ml Trypsin/EDTA-Lösung,
4. Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 10 Minuten,
5. Neutralisation der Trypsinwirkung durch Zugabe von 2,5ml Nährmedium,
6. Zentrifugieren bei 1240 Umdrehungen/Minute (270g) (Zentrifuge: Universal 16; Fa. Andreas Hettich GmbH&CO KG, Tuttlingen, Deutschland) für 5 Minuten,
7. Entfernen des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in 1ml Nährlösung,
8. Verdünnung eines Aliquot von 10µl mit 90µl Nährlösung zur Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer zur Bestimmung der Anzahl Zellen pro ml (Dies war die Grundlage zur Beimpfung der „wells“ der Zellkulturplatten.),
9. Resuspension eines Aliquots der Zellsuspension in ca. 20ml bis 25ml Nährlösung in einer 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche (Die Anzahl der Zellen und damit die Menge des Aliquot, welche zugefügt wurde, richtete sich variabel nach dem Zeitpunkt des nächsten Bedarfs an Zellen zur Zellstimulation.).

Hilfsmittel zum Auszählen in der Neubauer-Zählkammer:

Neubauer-Zählkammer

Neubauer Improved (0,0025mm<sup>2</sup>), 0,100mm Tiefe;  
Blaubrand®; Fa. Brand GmbH&Co KG, Wertheim,  
Deutschland

Deckgläser

Menzel-Gläser 20x20mm ,#1; Fa. Gerhard Menzel  
GmbH, Braunschweig, Deutschland; Katalog-Nr.  
BB020020A1

Mikroskop

Leica DM IL LED; Leica Microsystems GmbH,  
Wetzlar, Deutschland.

Das Auftauen der konservierten Zellen erfolgte folgendermaßen:

1. Vorgelegen von 5ml Nährlösung einem 50ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon™),
2. langsames Auftauen der Zellen, um ein Platzen zu verhindern; Röhrchen mit den gefrorenen Zellen („Zellröhrchen“) für 30 Sekunden in ein Wasserbad (37°C) halten,  
[Im „Zellröhrchen“ waren die Zellen in 1ml Gefriermedium (10% DMSO+90% FBS; DMSO = Dimethylsulfoxyd; FBS = fetales bovines Serum) suspendiert.]
3. 1ml Nährlösung aus dem Zentrifugenröhrchen in das „Zellröhrchen“ pipettieren und die Suspension aus dem „Zellröhrchen“ quantitativ in das Zentrifugenröhrchen überführen,
4. Zentrifugieren bei 1240 Umdrehungen/Minute (270g) (Zentrifuge: Universal 16; Fa. Andreas Hettich GmbH&CO KG, Tuttlingen, Deutschland) für 5 Minuten,
5. Zellen vom Überstand (Nährlösung plus Gefriermedium) befreien (dekantieren),
6. Zugabe von 1ml Nährlösung, Resuspendieren der Zellen,
7. quantitatives Überführen der Zellsuspension in ca. 20ml bis 25ml Nährlösung in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche.

### **3.2.2 Herstellung der Lösungen zur Stimulation**

LPS, PAM3CysSK4, Flagellin und Poly(I:C) wurden in Aqua ad iniectabilia (Bestandteil der Lieferung) gelöst, Hyaluronidase wurde in M2 gelöst (Stammlösung [10mg/ml]). Von Fe(II)SO<sub>4</sub> wurde durch Lösung in Aqua ad iniectabilia eine Stammlösung der Konzentration [200mg/ml] hergestellt. Zu Herstellung der EDTA-Lösung wurden Sarstedt-Röhrchen (K-EDTA) mit der vorgegebenen Menge (2,7ml NaCl) aufgefüllt, um eine Konzentration von [1,6mg/ml] EDTA zu erhalten. Weitere Verdünnungen erfolgten je nach Versuch in reinem DMEM-GlutaMAX-I oder Aqua ad iniectabilia oder M2.

**Tabelle 4: Referenzen für Anhaltspunkte zur Wahl der Konzentrationen**

<b>Substanz</b>	<b>Referenz</b>
Hyaluronsäure	Termeer et al. (2002)
LPS	Lim et al. (2011) Termeer et al. (2002)
Pam3CysSK4	van Maren et al. (2011), Brown et al. (2007)
Polymyxin B	Cardoso et al. (2007)
Flagellin	Kwon et al. (2011)
Poly(I:C)	Kumar et al. (2006)
FeSO <sub>4</sub>	McNeil et al. (1989) He et al. (2008)
EDTA	McNeil et al. (1989)

### 3.2.3 Stimulation

Für die Stimulation wurden jeweils „24-well-plates“ mit 50000-100000 Zellen pro „well“ mit 400µl Nährmedium (mit DMEM, siehe oben) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Bildung einer geschlossenen Zellschicht am Boden des „wells“ erfolgte die Stimulation. Zuerst wurden die „wells“ mit jeweils 400µl DPBS gewaschen, um dann entweder mit 220 oder 300µl Inkubationsmedium beschickt zu werden. Die Hälfte des Inkubationsmediums, also 110µl respektive 150µl, war Nährmedium (mit DMEM, siehe oben), der Rest setzte sich aus den Agenzien oder den Lösungsmitteln der Agenzien zusammen. Somit enthielt der, im Weiteren als „Kontrolle“ bezeichnete, Ansatz ausschließlich Nährmedium und die Lösungsmittel der Agenzien. Die Zeit der Inkubation im Inkubator lag zwischen 12 und 18 Stunden. Zur Untersuchung der Hyaluronidase wurde für einen Ansatz das Nährmedium durch reines RPMI 1640 ersetzt.

### 3.2.4 Auswertung der Versuche

#### 3.2.4.1 Prinzip

Untersucht wurde der Überstand jedes „wells“ mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay, antikörperbasiertes Nachweisverfahren). Es wurde ausschließlich der IL-6 (Interleukin-6)-ELISA (Maus) der Firma BD Biosciences, Katalog-Nr. 555240 nach Herstelleranweisung verwendet. Als Substrat der

Meerrettichperoxidase wurde BDOptEIA (Fa. BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland; Katalog-Nr. 555214) verwendet, als „Stop-Solution“ diente 1 M (2N)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . [Anmerkung: BDOptEIA besteht aus Reagenz A ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Reagenz B (3,3',5,5' Tetramethylbenzidin)]. Die Zeit der Umschlagreaktion war variabel, so dass die Zugabe der „Stop-Solution“ nach visueller Kontrolle erfolgte. Bei zu starker Intensität des Farbumschlages war dieser durch das Fotometer nicht mehr quantitativ erfassbar.

Durchgeführt wurde die Auswertung auf einer „96-well-plate“ (NUNC-Immunoplate, NUNC A/S, Roskilde, Dänemark; Katalog-Nr. 439454).

Das Prinzip der Nachweismethode ist ein Sandwich-ELISA mit den Schritten:

1. Beschichten der (Kunststoff-)Platte („96-well-plate“) mit einem Antikörper (Capture antibody) gegen IL-6 (zum Binden von IL-6 in der Probe), Inkubation über Nacht bei 4°C, danach Waschen der Platte,
2. Blocken der freien (proteinbindenden) Stellen der Platte mit verdünntem fetalen bovines Serum, Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur, danach Waschen der Platte,
3. Beimpfen der „wells“ mit den Proben sowie einer Verdünnungsreihe von IL-6 mit bekannter Konzentration (das Prinzip des ELISA beruht auf einem Vergleich der Konzentrationen), Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur, danach Waschen der Platte,
4. Zugabe eines Antikörpers gegen IL-6, der sich an das (am Capture antibody) gebundene IL-6 anheftet, zusammen mit Meerrettichperoxidase, welche sich an den Antikörper heftet, Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur, danach Waschen der Platte,
5. Zugabe des Substrates der Meerrettichperoxidase ( $\text{H}_2\text{O}_2$  + 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin), Inkubation (im Dunkeln, bei Raumtemperatur),
6. Zugabe von 1 M (2N)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zur Beendigung der Aktivität der Meerrettichperoxidase.
7. Auswertung per Fotometer bei einer Wellenlänge von 450nm.

Der ELISA birgt bei jedem der einzelnen Schritte Fehlerquellen. Zudem ist die Genauigkeit bei der Aliquotierung der Standardlösung sehr wichtig für die Absolutwerte, da der ELISA auf dem Prinzip des Vergleiches des Standards mit der zu testenden Substanz beruht. Ein direkter quantitativer Vergleich erfolgte im

Rahmen der vorliegenden Arbeit aus diesem Grunde vorwiegend innerhalb eines Versuches (gleiche Inkubationsbedingungen und gleiches Auswertungssystem auf ein und derselben Platte). Ein weiterer Vergleich war mit Bezug auf den Kontroll-Ansatz möglich, wurde aber auf Grund des unterschiedlichen Verhaltens des Kontrollansatzes bei unterschiedlichen Versuchen sehr kritisch betrachtet.

#### **3.2.4.2 Apparative Hilfsmittel**

Zum Einsatz kam ein automatisches Waschgerät ELx50™ (Microplate Strip Washer) der Firma BioTek (Winooski, VT 05404, USA). Als Waschflüssigkeit diente eine PBS-Lösung (phosphate buffered saline) mit 0,05% Tween, einem nichtionischen Tensid (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland; Katalog-Nr. 93773-250G). Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450nm am Fotometer (TECAN GENios plus; Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz), welches an einem Computer der Marke Dell-Dimension 4300 (Fa. Dell GmbH, Frankfurt, Deutschland) und einem Bildschirm der Marke „iiyama Vision master 17“ (Iiyama Deutschland GmbH, Rohrbach, Deutschland) angeschlossen war. Das Betriebssystem zum Ablesen lautete „XFluor4“ (Software des Fotometers TECAN GENios plus; Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz). Die Auswertung der Resultate der ELISA-Messung erfolgte nach Angaben des Herstellers im Excel-Programm (Fa. Microsoft, Redmond, WA 98052-6399 USA).

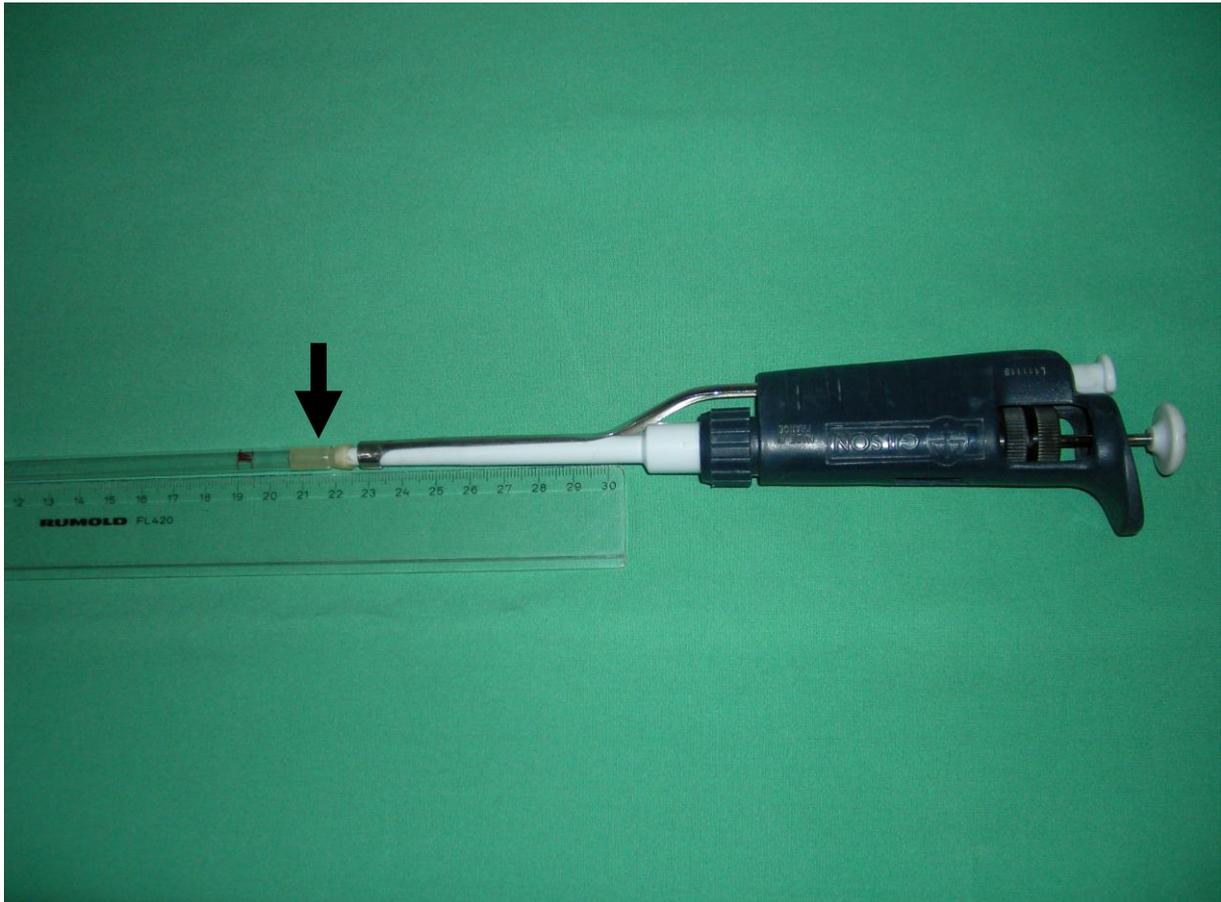
#### **3.2.5 Untersuchung der Hyaluronsäure in einem Versuchsaufbau ohne Zellen**

Ein Versuch lief in einer Eppendorfküvette (1,5ml) ab. Dazu wurden jeweils 500µl Hyaluronsäure (HyGAG) mit 50µl unbehandelter bzw. hitzebehandelter Hyaluronidase (95°C, 60 Minuten bzw. 70°C, 30 Minuten) inkubiert. Nach der Hitzebehandlung wurde die Hyaluronidase sofort auf Eis gestellt. Als Kontrolle dienten ein Gefäß mit 500µl Hyaluronidase und 50µl M2-Medium, da die Hyaluronidase in M2 gelöst war sowie ein Gefäß mit 500µl Aqua und 50µl M2-Medium. Die Auswertung nach einem Tag, Inkubation bei Raumtemperatur (22°C) für 14 Stunden und bei 4°C für 10 Stunden, erfolgte visuell und wurde mittels Kamera (Xacti, Fa. SANYO Electric Co., Ltd., Osaka, Japan) fotodokumentiert.

Zudem wurde das Prinzip der Viskositätsmessung als Flussgeschwindigkeit einer Flüssigkeit in einer Kapillare angewandt. Hierfür wurde für jedes Eppendorfgefäß

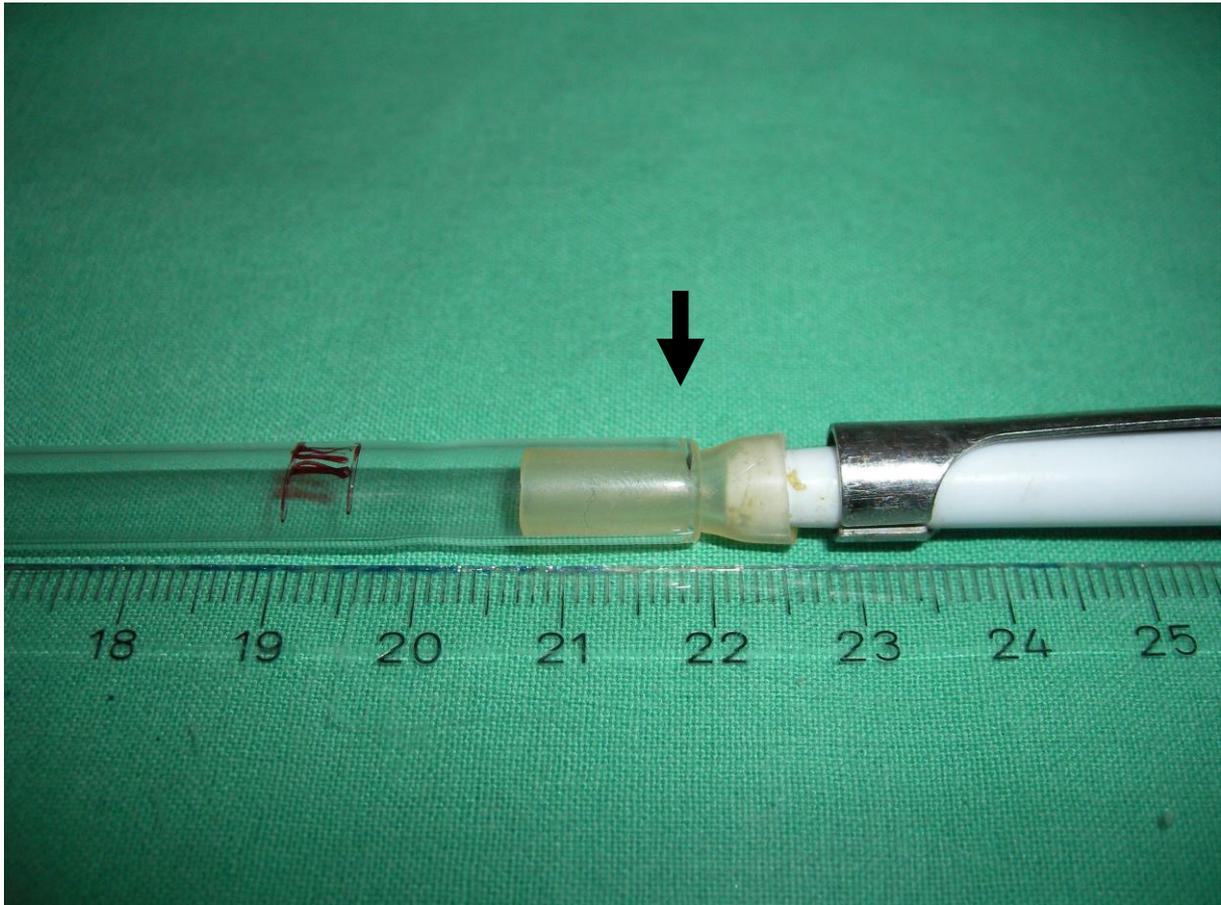
eine Pasteurpipette aus Glas der Fa. Peske (Josef Peske GmbH&CO KG, Aindling-Arnhofen, Deutschland; Katalog-Nr. 5672-00) folgendermaßen vorbereitet:

3,2cm und 4,65cm vom Ende der Pasteurpipettenspitze wurde jeweils eine Markierung angebracht. In das Ende der Pasteurpipette wurde 1,9cm langer Gummischlauch gesteckt, welcher die daran angeschlossene 200 $\mu$ l-Pipette (auf 70 $\mu$ l eingestellt) mit der Pasteurpipette verband und für einen luftdichten Abschluss sorgte.



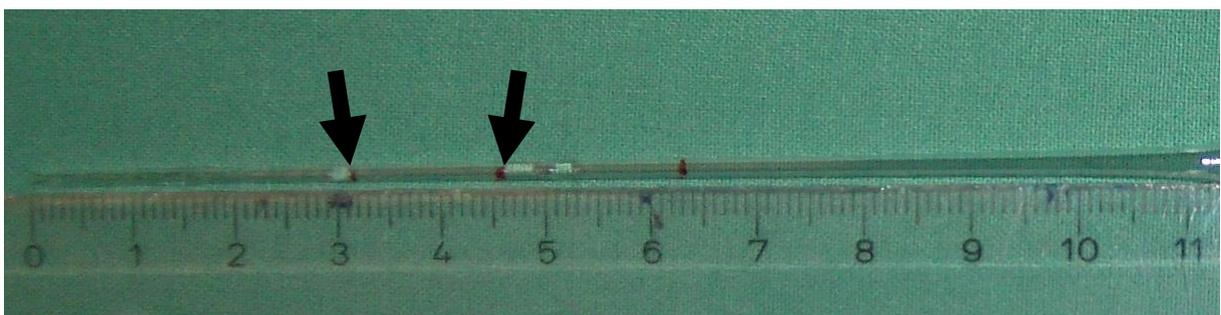
**Abb. 5 a Anordnung für die Messung der Flussgeschwindigkeit**

In Abb. 5 a ist das System, bestehend aus der 200 $\mu$ l-Pipette, dem 1,9cm langen Gummischlauch (Verbindungsstück, siehe Pfeil) und der Pasteurpipette aus Glas, dargestellt.



**Abb. 5 b Verbindung Mikroliterpipette-Pipettenspitze**

Zu sehen ist eine Ausschnittsvergrößerung der Abb. 5 a, welche den Gummischlauch (Verbindungsstück, siehe Pfeil) genauer darstellt.



**Abb. 5 c Pipettenspitze**

Dargestellt ist die Spitze der Pasteurpipette des Systems der Abb. 5 a. Zwischen den Markierungen (Pfeile) erfolgte Zeitnahme für die Flussgeschwindigkeit. Sobald der Flüssigkeitsspiegel bei 3,2cm angekommen war, begann die Zeitnahme, sobald der Spiegel bei 4,65cm angekommen war wurde die Zeitnahme beendet.

Die Pipette wurde senkrecht in das Eppendorfgefäß gestellt und der Stempel der Pipette losgelassen. Mit einer Handstoppuhr wurde die Zeit ermittelt, welche die Flüssigkeit für das Zurücklegen der Strecke zwischen den beiden Markierungen benötigte. Es wurde eine Messserie von zehn Wiederholungen durchgeführt. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur (zum Zeitpunkt der Messung 22°C).

In einem weiteren Versuch zur Abschätzung der Viskosität im Vergleich wurden fünf Eppendorfküvetten (1,5ml) folgendermaßen präpariert:

A: 500µl Hyaluronsäure (HyGAG™) + 100µl NaCl 0,9%

D: 500µl Hyaluronsäure + 50µl Fe(II)SO<sub>4</sub> [1,52mg/ml] + 50µl NaCl 0,9%

E: 500µl NaCl 0,9% + 50µl Fe(II)SO<sub>4</sub> [1,52mg/ml] + 50µl EDTA [1,6mg/ml]

Die Inkubationszeit betrug 10 Tage (2 Tage bei Raumtemperatur (23°C), 8 Tage bei 4°C). Die Auswertung erfolgte per Fotodokumentation.

### **3.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Computerprogramme Excel (Fa. Microsoft, Redmond, WA 98052-6399 USA) und „GraphPad Prism 5“ (Fa. GraphPad Software, Inc., 2236 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037 USA). „GraphPad Prism 5“ diente auch der graphischen Darstellung. In den Tabellen wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Als statistischer Test wurde der unpaare T-Test angewendet. Die Zahlenwerte der Signifikanz wurden ausschließlich in den Tabellen angegeben. In den Grafiken wurde der Grad der Signifikanz mit ns (nicht signifikant) und den Graden eins bis vier als \* bis \*\*\*\* dargestellt.

## 4 Ergebnisse

Aus Gründen der Übersicht sind in diesem Kapitel die Ergebnisse nur graphisch dargestellt. Die zugehörigen Tabellen finden sich im Anhang. In den Grafiken wurde bei gleichbleibenden Konzentrationen nur einmal die Konzentration der jeweiligen Substanz im jeweiligen Versuch angegeben. Generell wurden die Zellen in jedem Versuch zumindest 12 Stunden maximal jedoch 18 Stunden inkubiert, so dass die Zeit nicht mehr gesondert angegeben wird. [Anmerkung: Die Induktion von IL-6 gehört zur Akut-Phase-Antwort (Mihara et al., 2012).]

### 4.1 Verzeichnis der im Abschnitt „Ergebnisse“ verwendeten Abkürzungen

Fe	FeSO <sub>4</sub>
F/E	FeSO <sub>4</sub> + EDTA
FLAG	Flagellin
HA[L]	Hyaluronsäure 1500Da(lton) – 3000Da
HA[S]	Hyaluronsäure <1500Da
HEP	Heparin
HMW	high molecular weight, große Molekülmasse
HYAL	Hyaluronidase
LMW	low molecular weight, niedrige Molekülmasse
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minuten
ns	nicht signifikant
PAM	PAM3CysSK4
pMC/TLR2-/-	primären Mesangialzellen von C57/Black-6-Mäusen mit homozygotem Knockout für den Toll-like-Rezeptor 2
pMC/TLR4-/-	primären Mesangialzellen von C57/Black-6-Mäusen mit homozygotem Knockout für den Toll-like-Rezeptor 4
PMB	Polymyxin B
Poly	Poly(I:C)
Vit.C	Vitamin C, Ascorbinsäure
* bis ****	vier Grade der Signifikanz (T-Test)

## 4.2 Untersuchungsergebnisse

### 4.2.1 Stimulation mit Hyaluronsäure < 3000Da

Zunächst sollte untersucht werden, an welchen Rezeptor, entsprechend der Fragestellung, Hyaluronsäure bindet. Dafür wurden die pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen und die pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen mit LPS ([5µg/ml] und [10µg/ml]), PAM3CysSK4 ([100ng/ml]) und Hyaluronsäure der Molekülmassen <1500Da (HA[S]) und 1500Da bis 3000Da (HA[L]) (jeweils [10µg/ml] und [50µg/ml]) inkubiert. [Anmerkung: Ab einer Konzentration von [25µg/ml] wurde eine Sättigungskinetik für Hyaluronsäure am TLR4 beschrieben (Termeer et al., 2002).]. Für jeden Ansatz wurden jeweils 2 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.

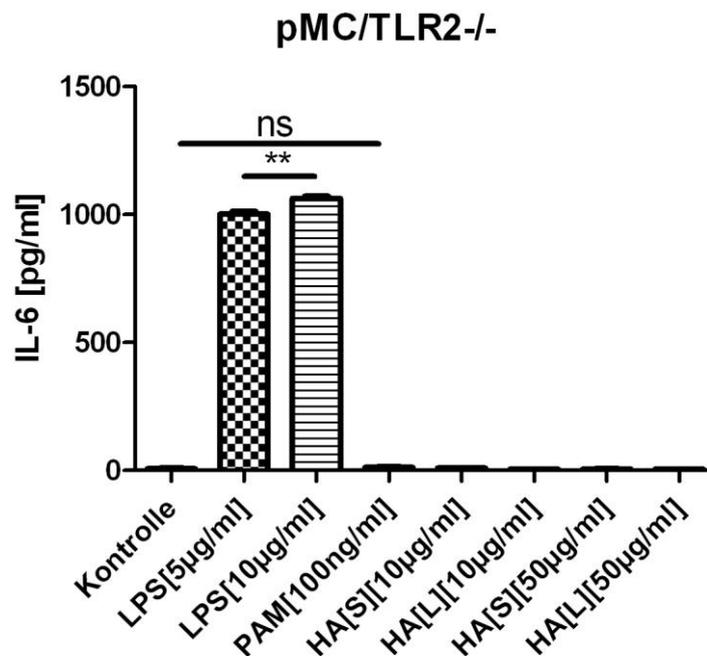
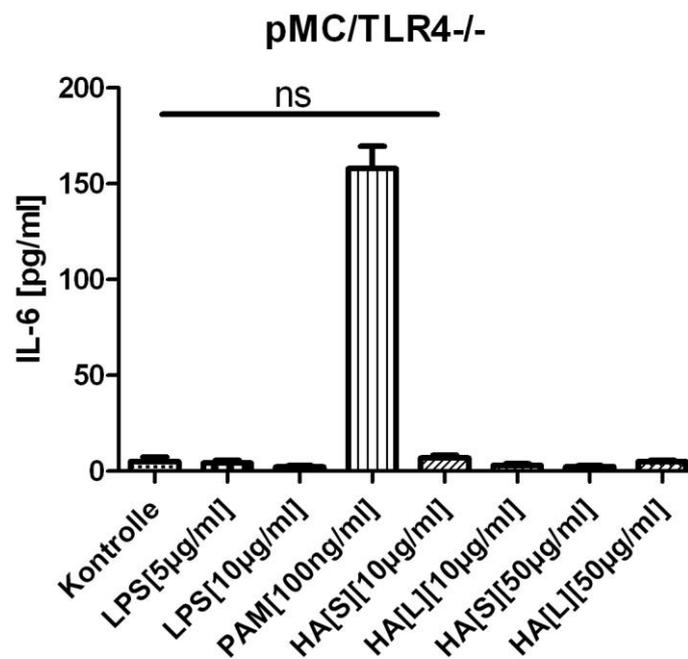


Abb. 6 a Stimulation der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen mit Hyaluronsäure <3000Da

Die Inkubation der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen mit LPS zeigte eine deutliche Expressionserhöhung von Interleukin 6 (IL-6) gegenüber der Kontrolle. Hingegen blieb die IL-6-Expression bei Stimulation sowohl mit PAM3CysSK4 als auch mit unterschiedlichen Konzentrationen von Hyaluronsäure einer Molekülmasse von unter 1500Da sowie 1500Da bis 3000Da auf dem Niveau der Kontrolle, was als fehlende Stimulierbarkeit mit PAM3CysSK4 bzw. Hyaluronsäure gewertet wurde. Die fehlende Stimulierbarkeit durch PAM3CysSK4 wurde als Bestätigung des Knockout-Status der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen angesehen. Gleichzeitig zeigte die hohe IL-6-Expression bei

der Stimulation mit LPS, dass der dem TLR4 nachgeschaltete Signalweg intakt war. Aus der fehlenden Stimulierbarkeit durch Hyaluronsäure ließ sich einerseits schließen, dass die Hyaluronsäure nicht mit LPS kontaminiert war, andererseits war eine intrinsische Aktivität über den TLR4 nicht erkennbar. Im nächsten Versuch wurden die pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen in gleicher Weise stimuliert wie die im vorherigen Versuch die pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen. Für jeden Ansatz wurden jeweils 2 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



**Abb. 6 b Stimulation der pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen mit Hyaluronsäure <3000Da**

Die Inkubation der pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen mit PAM3CysSK4 zeigte eine deutliche Expressionserhöhung von IL-6 gegenüber der Kontrolle. Hingegen blieb die IL-6-Expression bei Stimulation sowohl LPS mit als auch mit unterschiedlichen Konzentrationen von Hyaluronsäure einer Molekülmasse von unter 1500Da sowie 1500Da bis 3000Da auf dem Niveau der Kontrolle, was als fehlende Stimulierbarkeit durch die Hyaluronsäure dieser Molekülmasse gewertet wurde. Die fehlende Stimulierbarkeit durch LPS bestätigte den Knockout-Status der pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen. Zudem zeigte sich, dass der Signalweg, welcher nach Stimulation des TLR2 zur Expression von IL-6 führt, intakt war. Ein intrinsischer Effekt der Hyaluronsäure der Molekülmasse bis 3000Da in einer Konzentration bis zu [50µg/ml] auf den TLR2 konnte nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend bestätigten die spezifischen Liganden der TLR im Sinne von Positivkontrollen den jeweiligen Knockout-Status der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen und der pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen. Zudem war festzustellen, dass der Signalweg von der TLR-Aktivierung bis zur IL-6-Expression intakt war. Die Inkubation mit Hyaluronsäure der Molekülmasse bis 3000Da bei einer Konzentration bis [50µg/ml] führte weder zu einer nachweisbaren Stimulation des TLR2 noch des TLR4.

Nun sollte ermittelt werden, ob Hyaluronsäure einer Molekülmasse <3000Da einen Einfluss auf die Wirkung von LPS am TLR4 bzw. von PAM3CysSK4 am TLR2 hat oder ob Hyaluronsäure die Bindung von LPS am TLR2 oder von PAM3CysSK4 am TLR4 vermitteln konnte. Dafür erfolge die Co-Inkubation der Hyaluronsäure <1500Da und 1500Da bis 3000Da in einer Konzentration von jeweils [50µg/ml] mit dem jeweiligen Rezeptorliganden. Als Vergleich diene die alleinige Inkubation mit dem Rezeptorliganden. Dabei wurde für LPS eine Konzentration von [1µg/ml] und für PAM3CysSK4 eine Konzentration von [100ng/ml] gewählt. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.

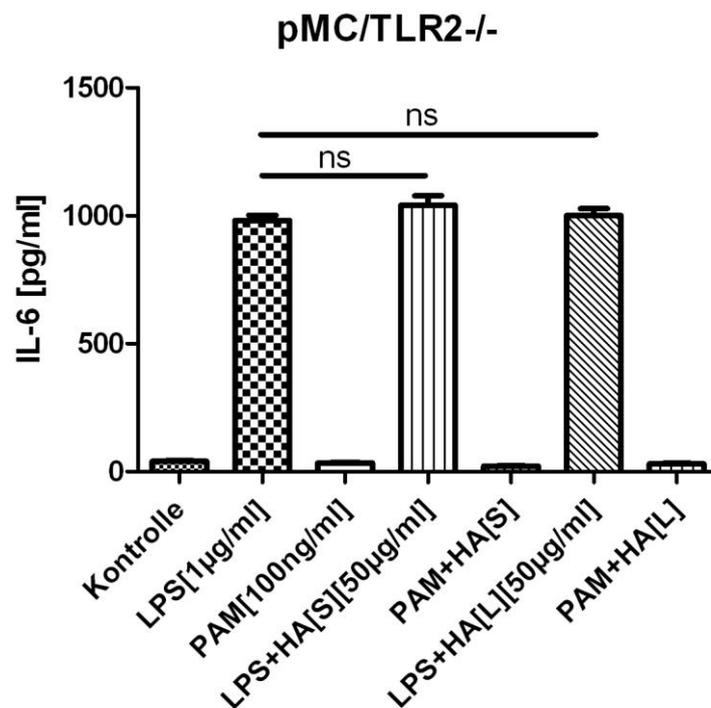
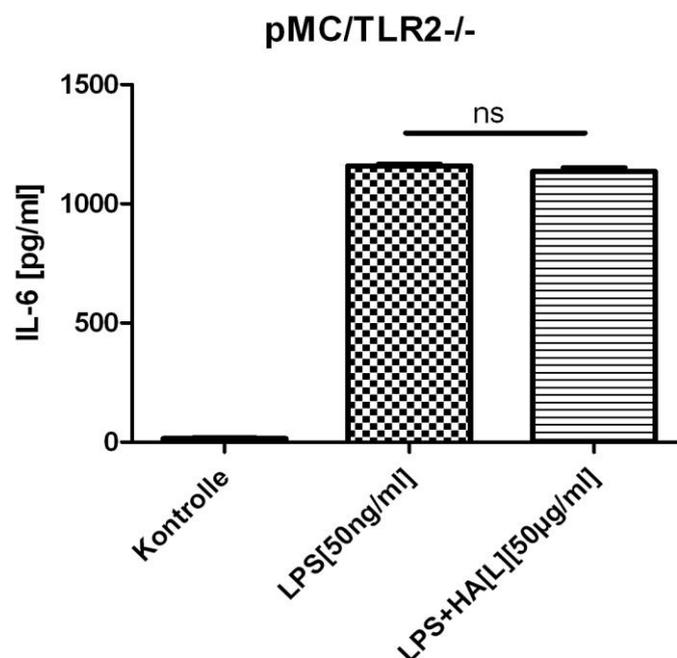


Abb. 7 a-1 Co-Stimulation der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen mit Hyaluronsäure und LPS bzw. PAM3CysSK4

Die Co-Inkubation der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen mit LPS und Hyaluronsäure bis zu einer Molekülmasse von 3000Da bei einer Konzentration von [50µg/ml] zeigte keinen signifikanten Unterschied in der IL-6-Expression gegenüber der alleinigen Inkubation mit LPS, was als Fehlen eines modulierenden Effektes am TLR4-Rezeptor gewertet wurde. Der gleiche Versuchsansatz mit PAM3CysSK4 anstelle von LPS führte zu einer IL-6-Expression der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen auf dem Niveau der Kontrolle. Eine Vermittlerfunktion von Hyaluronsäure einer Molekülmasse bis zu 3000Da zur Bindung von PAM3CysSK4 am TLR4 konnte somit ausgeschlossen werden.

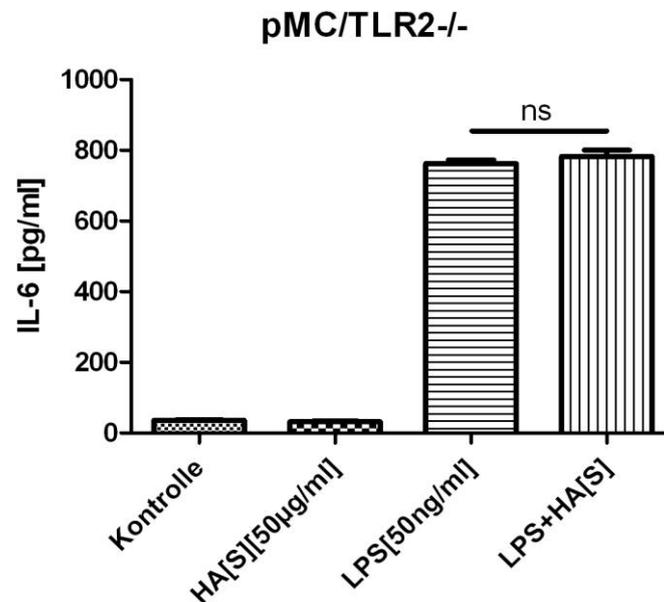
Um zu untersuchen, ob Hyaluronsäure einer Molekülmasse <3000Da die Wirkung von LPS am TLR4 bei geringerer LPS-Konzentration beeinflusst, wurde die Co-Inkubation von Hyaluronsäure und LPS mit wesentlich geringerer LPS-Konzentration [50ng/ml] in einer Zellkultur mit pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen wiederholt. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



**Abb. 7 a-2 Co-Stimulation der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen mit Hyaluronsäure und LPS (I)**

Die Co-Inkubation von LPS und Hyaluronsäure der Molekülmasse 1500Da bis 3000Da (HA[L]) in einer Konzentration von [50µg/ml] zeigte keinen signifikanten Unterschied in der IL-6 gegenüber der alleinigen Inkubation mit LPS. Damit wurde

ein modulierender Effekt der Hyaluronsäure dieser Molekülmasse bis zu dieser Konzentration am TLR4 ausgeschlossen.

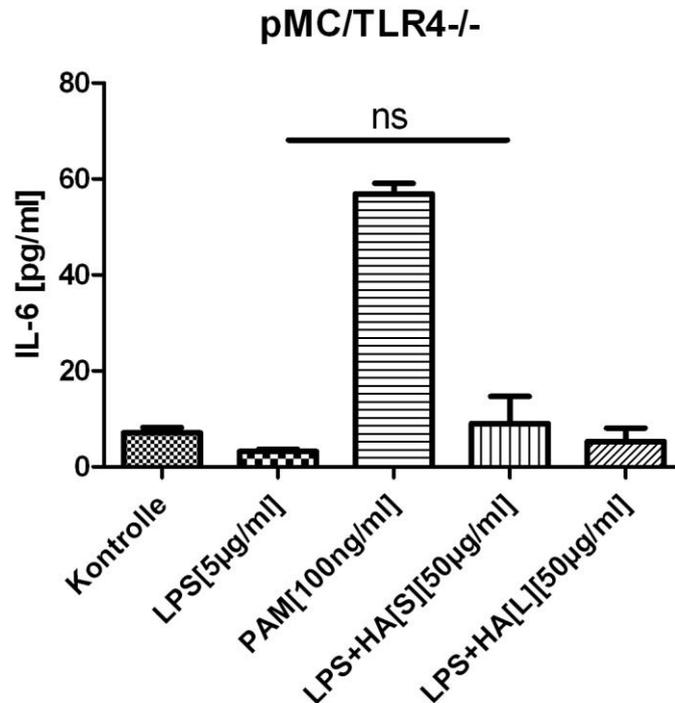


**Abb. 7 a-3 Co-Stimulation der pMC/TLR2-/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS (II)**

Auch für die Co-Inkubation von LPS [50ng/ml] mit Hyaluronsäure der Molekülmasse <1500Da (HA[S]) zeigte sich gegenüber der alleinigen Inkubation mit LPS kein signifikanter Unterschied in der IL-6-Expression. Somit konnte auch nach deutlicher Reduktion der LPS-Konzentration von [1µg/ml] auf [50ng/ml] im Rahmen eines weiteren Versuches kein modulierender Effekt der Hyaluronsäure einer Molekülmasse unter 3000Da in einer Konzentration von [50µg/ml] auf den TLR4 nachgewiesen werden. Für den TLR4 ließ sich somit für Hyaluronsäure der Molekülmasse <3000Da in einer Konzentration bis zu [50µg/ml] weder ein intrinsischer Effekt, noch ein modulierender Effekt nachweisen.

Nun war noch die Frage von Interesse, ob Hyaluronsäure einer Molekülmasse <3000Da eine Vermittlerfunktion für eine Bindung von LPS am TLR2 zugeschrieben werden konnte. Für diesen Versuch wurde für LPS eine Konzentration von [5µg/ml] gewählt, um einen Substratmangel auf der Seite des LPS auszuschließen. Hyaluronsäure sowohl der Molekülmasse <1500Da als auch der Molekülmasse 1500Da bis 3000Da wurde erneut in der Konzentration von [50µg/ml] eingesetzt. Für diese Untersuchung wurden pMC/TLR4-/- Zellen verwendet. Als Positivkontrolle diente PAM3CysSK4 in einer Konzentration von [100ng/ml]. Für jeden Ansatz

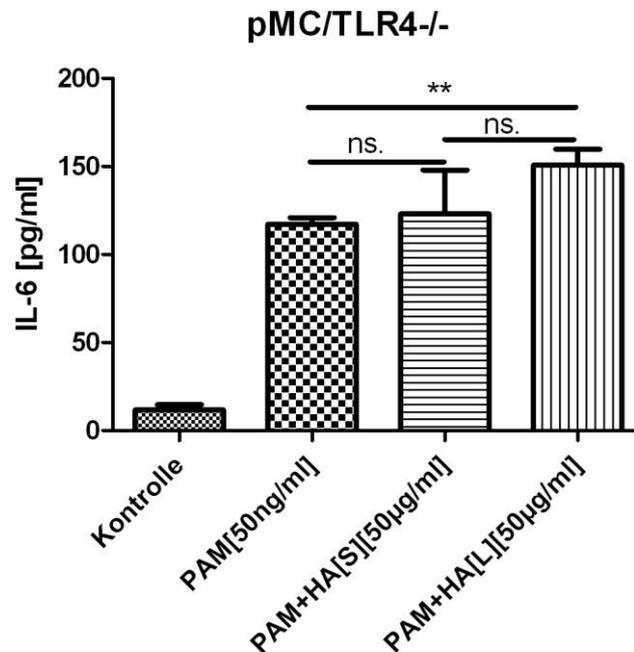
wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



**Abb. 7 b-1 Co-Stimulation der pMC/TLR4-/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS**

Bei Co-Inkubation der pMC/TLR4-/- Zellen mit LPS und Hyaluronsäure einer Molekülmasse unter 3000Da in einer Konzentration von [50µg/ml] blieb die IL-6-Expression ebenso auf dem Niveau der Kontrolle wie die Inkubation mit LPS alleine. Eine Stimulierbarkeit des TLR2 durch eine Kombination von LPS mit Hyaluronsäure einer Molekülmasse unter 3000Da und damit einer Vermittlerfunktion für die Bindung von LPS am TLR2 konnte damit verneint werden.

Schließlich wurde im Rahmen der Untersuchung der Hyaluronsäure einer Molekülmasse <3000Da untersucht, ob eine modulierende Wirkung auf den PAM3CysSK4-Effekt am TLR2 besteht. Dafür wurde, in Analogie zur Wahl der LPS-Konzentration in vorhergehenden Versuch, auch die Konzentration von PAM3CysSK4 auf ein Niveau von [50ng/ml] gesenkt. Sowohl für die Hyaluronsäure der Molekülmasse <1500Da als auch für die Hyaluronsäure der Molekülmasse 1500Da bis 3000Da wurde die Konzentration von [50µg/ml] beibehalten. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



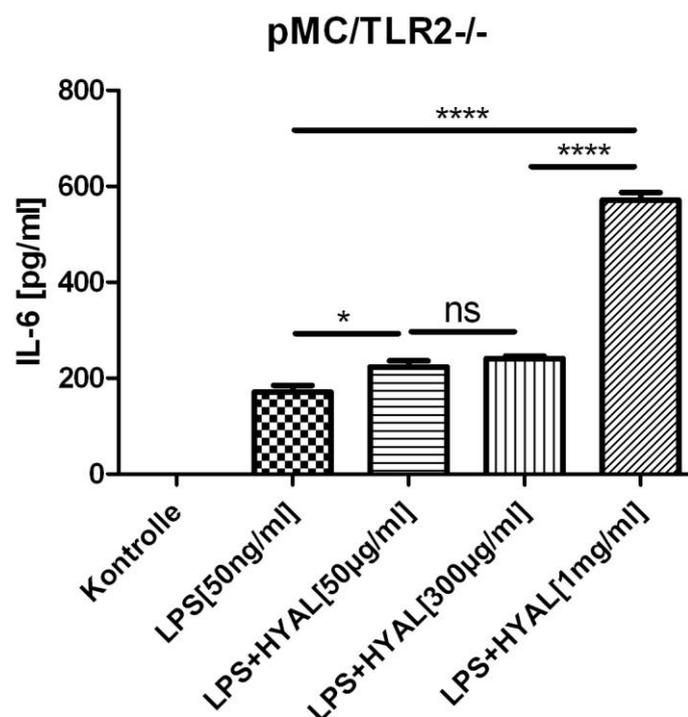
**Abb. 7 b-2 Co-Stimulation der pMC/TLR4-/- Zellen mit Hyaluronsäure und PAM3CysSK4**

Bei Inkubation der pMC/TLR4-/- Zellen mit der Kombination von Hyaluronsäure einer Molekülmasse <1500Da mit PAM3CysSK4 gab es für die IL-6-Expression keinen signifikanten Unterschied nicht signifikant, so dass für die Hyaluronsäure dieser Molekülmasse ein modulierender Effekt am TLR2 ausgeschlossen wurde. Für die Molekülmasse 1500Da bis 3000Da zeigte bei Co-Inkubation mit PAM3CysSK4 kein signifikanter Unterschied im Vergleich mit der Co-Inkubation von Hyaluronsäure einer Molekülmasse bis 1500Da mit PAM3CysSK4. Allerdings war der Unterschied gegenüber der Inkubation mit PAM3CysSK4 alleine von einem signifikanten Unterschied in der IL-6-Expression begleitet. Für die Hyaluronsäure der Molekülmasse von 1500Da bis 3000Da war der sichere Ausschluss einer Verstärkung der Wirkung von PAM3CysSK4 am TLR2, auf Grund der vorliegenden Untersuchung, nicht möglich.

Zusammenfassend war für Hyaluronsäure <3000Da bis zu einer Konzentration von [50µg/ml] keine intrinsische Aktivität am TLR4 und TLR2 nachweisbar. Auch ein modulierender Effekt am Rezeptor konnte weitgehend ausgeschlossen werden. Lediglich für Hyaluronsäure einer Molekülmasse von 1500Da bis 3000Da war eine Verstärkung des Effektes des spezifischen Liganden am TLR nicht auszuschließen.

#### 4.2.2 Die Wirkung von Hyaluronidase

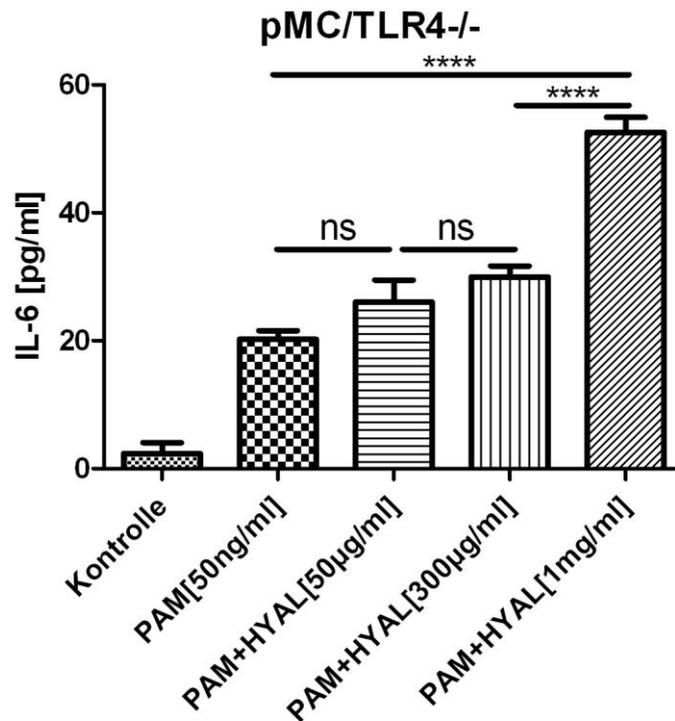
Um die Wirkung unterschiedlich großer Hyaluronsäuremoleküle zu prüfen, wurde der die Mesangialzellen umgebende Hyaluronsäuremantel dem Einfluss von Hyaluronidase ausgesetzt. So konnten unterschiedlich große Hyaluronsäuremoleküle generiert werden, welche bei passender Größe am TLR andocken konnten. Es war zu ermitteln, ob Hyaluronsäure alleine (Inkubation nur mit Hyaluronidase) einen Effekt hat oder die Wirkung von TLR-Liganden am TLR verändert. Zunächst wurde der Einfluss von Hyaluronidase auf die Wirkung der Liganden untersucht. Von Interesse war, eine Hyaluronidase-Konzentration zu finden, für welche ein sicherer Effekt besteht. Zunächst wurde LPS [50ng/ml] in mit unterschiedlichen Konzentrationen von Hyaluronidase ([50µg/ml], [300µg/ml] und [1mg/ml]) inkubiert. Verwendet wurden pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



**Abb. 8 a** Hyaluronidase-Verdünnungsreihe bei gleichbleibender LPS-Konzentration (pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen)

Es zeigte sich die Tendenz der Zunahme der IL-6-Expression bei Inkubation der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen mit steigender Hyaluronidasekonzentration in Kombination mit gleichbleibender Konzentration von LPS. Erst bei einer Hyaluronsäurekonzentration von [1mg/ml] in Kombination mit LPS war ein deutlicher Unterschied in der IL-6-Expression gegenüber LPS alleine zu erkennen.

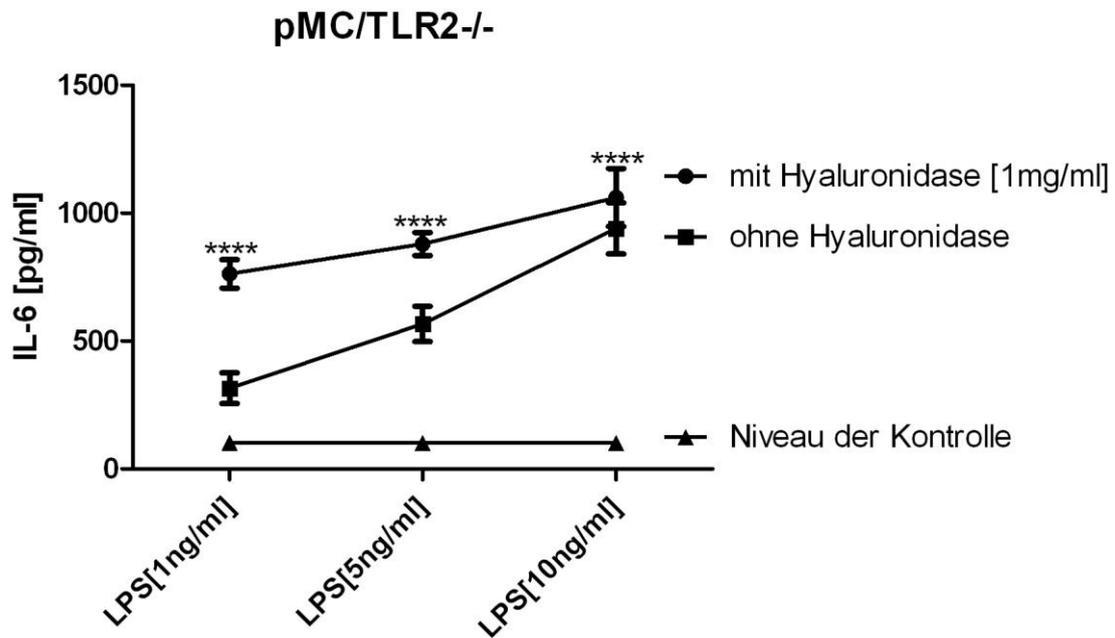
In einem analogen Versuchsaufbau mit gleichen Konzentrationen wurden nun die Hyaluronidase mit PAM3CysSK4 [50ng/ml] co-inkubiert. Zum Einsatz kamen pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



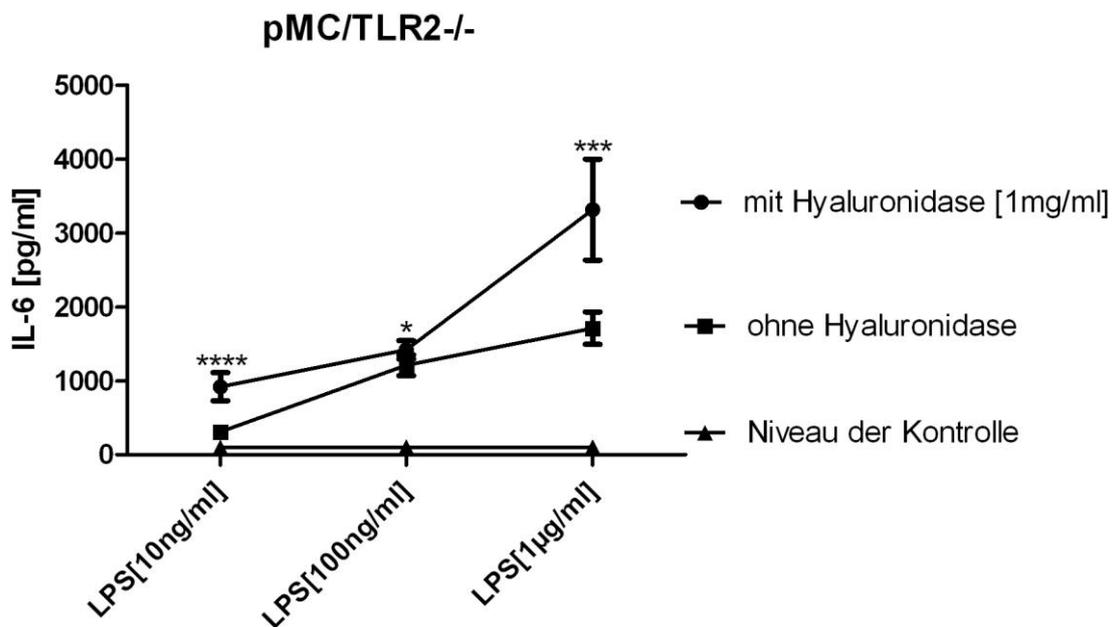
**Abb. 8 b** Hyaluronidase-Verdünnungsreihe bei gleichbleibender PAM3CysSK4-Konzentration (pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen)

Bei Inkubation der pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen mit konstanter PAM3CysSK4-Konzentration zeigte sich mit zunehmender Hyaluronidasekonzentration eine Zunahme der IL-6-Expression, welche erst bei einer Hyaluronidasekonzentration von [1mg/ml] deutlich stärker war als mit PAM3CysSK4 alleine.

Nach Ermittlung der wirksamsten Hyaluronidase-Konzentration ([1mg/ml]) wurde mit dieser Konzentration der modulierende Effekt auf die Wirkung der TLR-Liganden am jeweiligen TLR untersucht. Zunächst wurden pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen mit Hyaluronidase der Konzentration [1mg/ml] und LPS in unterschiedlichen Konzentrationen co-inkubiert und die IL-6-Expression mit der alleinigen Inkubation mit LPS der unterschiedlichen Konzentrationen verglichen. Dabei wurden für LPS die Konzentrationen [1ng/ml], [5ng/ml], [10ng/ml], [100ng/ml] und [1µg/ml] verwendet. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



**Abb. 9 a-1 LPS-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen) (I)**



**Abb. 9 a-2 LPS-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen) (II)**

Die Inkubation der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen mit LPS führte zu einer geringeren IL-6-Expression als die Co-Stimulation von LPS gleicher Konzentration mit Hyaluronidase [1mg/ml]. Die Unterschiede waren für alle Konzentrationen statistisch signifikant,

wobei sich für LPS [100ng/ml] nur eine geringe Signifikanz für den Unterschied mit und ohne Hyaluronidase ergab. Bei Konzentrationen unter [10ng/ml] LPS zeigte sich eine zunehmende Differenz der IL-6-Expression zwischen der Inkubation mit und ohne Hyaluronidase bei abnehmenden LPS-Konzentrationen. Das heißt, dass die Hyaluronidase bei geringer LPS-Konzentrationen nicht nur die Wirkung des zur Stimulation zugegebenen LPS verstärkte. So wurde ein Zusatzeffekt postuliert, welcher später noch zu analysieren war.

Zunächst sollte der Einfluss der Hyaluronidase auf die Wirkung von PAM3CysSK4 am TLR2 untersucht werden. Hierfür wurden pMC/TLR4-/- Zellen zum einen mit PAM3CysSK4 alleine, zum anderen in Kombination mit Hyaluronidase inkubiert. Während die Konzentration der Hyaluronidase unverändert blieb ([1mg/ml]), wurde PAM3CysSK4 in den Konzentrationen [1ng/ml], [5ng/ml], [10ng/ml] und [100ng/ml] eingesetzt. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.

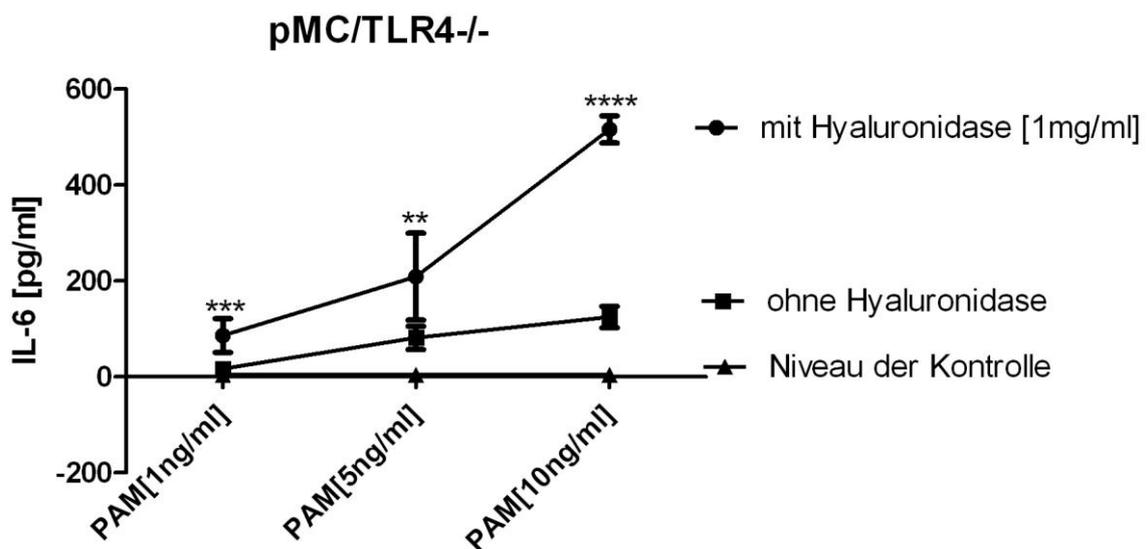
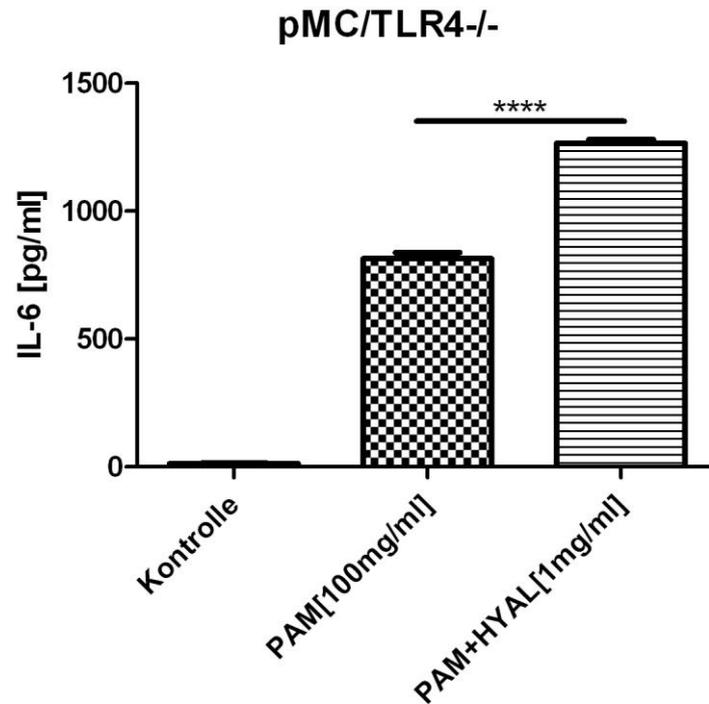


Abb. 9 b-1 PAM3CysSK4-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR4-/- Zellen) (I)

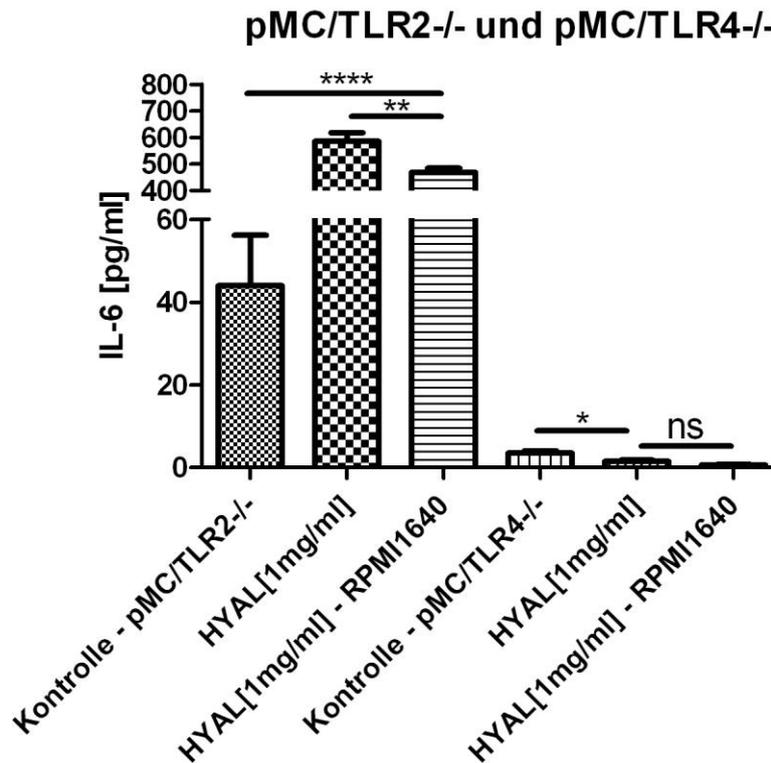


**Abb. 9 b-2 PAM3CysSK4-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR4-/- Zellen) (II)**

Die Inkubation der pMC/TLR4-/- Zellen mit PAM3CysSK4 führte zu einer geringeren IL-6-Expression als die Co-Inkubation von PAM3CysSK4 gleicher Konzentration mit Hyaluronidase [1mg/ml]. Die Unterschiede waren für alle Konzentrationen von PAM3CysSK4 statistisch signifikant. Bei abnehmender PAM3CysSK4-Konzentration zeigte sich eine abnehmende Differenz zwischen der Stimulation mit und ohne Hyaluronidase. Somit verstärkte die Hyaluronidase den Effekt von PAM3CysSK4 am TLR2, ohne dass ein Zusatzeffekt wie zuvor bei Stimulation des TLR4 durch LPS zu beobachten war.

Bei Inkubation mit abnehmenden Konzentrationen des spezifischen TLR-Liganden hatte sich im Vergleich mit und ohne Hyaluronidase unterschiedliche IL-6-Expressionsmuster ergeben. Während mit abnehmenden Konzentrationen des TLR-Liganden der Unterschied mit und ohne Hyaluronidase bezüglich der induzierten IL-6-Expression der pMC/TLR4-/- Zellen verminderte, wurde er schließlich bei den pMC/TLR2-/- Zellen größer. Von Interesse war, ob durch die Inkubation der pMC/TLR2-/- Zellen und der pMC/TLR4-/- Zellen alleine mit Hyaluronidase eine IL-6-Expression ausgelöst wurde. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob möglicherweise das Nährmedium dafür verantwortlich war. Hyaluronidase wurde in

der Konzentration [1mg/ml] verwendet. In diesem Versuch wurde für einen Ansatz das standardmäßig eingesetzte Nährmedium gegen RPMI 1640 ausgetauscht. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden. Um den Unterschied im Vergleich der Zellen zu illustrieren, wurden die Ergebnisse der Untersuchung beider Zelltypen in einer Grafik dargestellt.



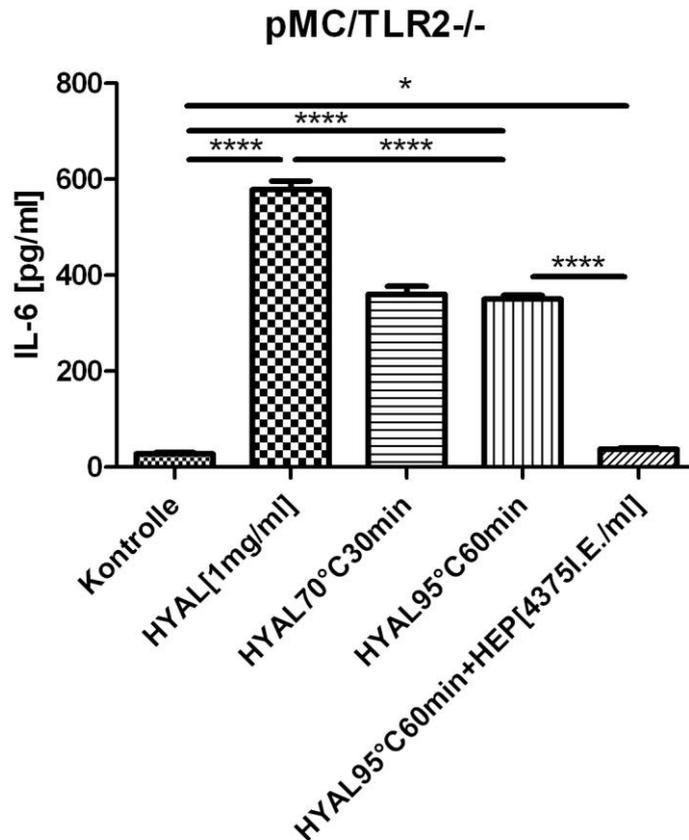
**Abb. 10** Zusammenschau des Vergleiches unterschiedlicher Nährmedien bei Inkubation von pMC/TLR2<sup>-/-</sup>-Zellen (links) und pMC/TLR4<sup>-/-</sup>-Zellen (rechts) mit Hyaluronidase

Die pMC/TLR2<sup>-/-</sup>-Zellen zeigten bei Inkubation mit Hyaluronidase einen massiven Anstieg der IL-6-Expression, während bei den pMC/TLR<sup>-/-</sup>-Zellen bei Inkubation die induzierte IL-6-Expression durch Hyaluronidase nicht über dem Niveau der Kontrolle lag. Der Effekt durch Hyaluronidase war also als ein Effekt am TLR4 zu deuten. Dieser Effekt nahm bei Austausch des Medium statistisch signifikant ab, wobei sich die Größenordnung der IL-6-Expression nur geringgradig änderte. Die IL-6-Expression blieb weiterhin weit über dem Niveau der Kontrolle. Folglich konnte die Stimulation zumindest überwiegend nicht auf die Inhaltsstoffe des Nährmediums zurückgeführt werden, so dass die erhöhte IL-6-Expression auf die Hyaluronidase zurückzuführen war. Bei Inkubation der pMC/TLR4<sup>-/-</sup>-Zellen mit Hyaluronidase lag

das Niveau der IL-6-Expression sowohl bei Verwendung von Nährmedium als auch bei der Verwendung von RPMI 1640 auf dem Niveau der Kontrolle.

Zusammenfassend zeigte die Hyaluronidase einen stimulierenden Effekt am TLR4. Der Einfluss des Mediums war minimal. Die Hypothese, dass die Wirkung von Inhaltsstoffen des Nährmediums am TLR4 durch Hyaluronidase verstärkt wurde und somit für die erhöhte IL-6-Expression verantwortlich war, konnte somit verworfen werden. Somit musste die erhöhte IL-6-Expression auf die Hyaluronidase zurückzuführen sein.

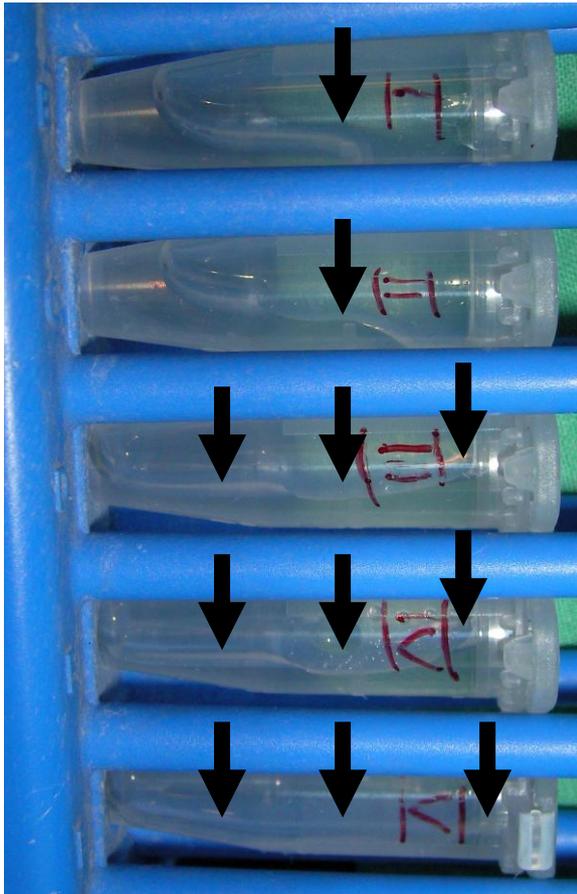
Nun sollte untersucht werden, ob die Enzymwirkung der Hyaluronidase die IL-6-Expression bedingte. Durch die Enzymwirkung wurde Hyaluronsäure unterschiedlicher Molekülmasse generiert. Wenn zumindest eine Molekülgröße der generierten Hyaluronsäure für die Wirkung verantwortlich war, so musste mit der Inaktivierung des Enzyms der Effekt der Hyaluronidase aufgehoben werden, da die Hyaluronsäure nicht mehr zu kleineren Molekülen abgebaut werden konnte. Somit sollte die Frage beantwortet werden, ob Hyaluronsäure zumindest einer Molekülmasse oder Größenordnung für die Wirkung am TLR4 verantwortlich war oder ob eine andere Ursache vorlag. Dafür wurde Hyaluronsäure einer Thermobehandlung bei unterschiedlichen Temperaturen für unterschiedliche Zeiträume unterzogen. Da Heparin als Hemmer der Hyaluronidase bekannt ist, wurde in einem Ansatz Heparin in einer Konzentration von [4375I.E./ml] eingesetzt. In diesem Falle erfolgte die Co-Inkubation mit bei 95°C für 60 Minuten hitzebehandelter Hyaluronidase [1mg/ml]. Weiterhin wurden unbehandelte Hyaluronidase [1mg/ml] und bei 70°C für 30 Minuten sowie bei 95°C für 60 Minuten behandelte Hyaluronidase [1mg/ml] untersucht. Wegen des Effektes am TLR4 kamen pMC/TLR2-/- Zellen zum Einsatz. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



**Abb. 11 a Untersuchung der hitzebehandelten Hyaluronidase (I)**

Die Inaktivierung der Enzymwirkung der Hyaluronidase führte zu einer signifikanten Reduktion der IL-6-Expression, welche jedoch weiterhin signifikant deutlich, im Sinne einer anderen Größenordnung, über jener der Kontrolle lag. Durch Heparin konnte die IL-6-Expression statistisch signifikant auf das Niveau der Kontrolle reduziert werden. Im nächsten Versuch diente der Überprüfung, ob die Hyaluronidase durch die Hitzebehandlung inaktiviert wurde.

Dafür wurden jeweils 500µl hochvisköser, hochmolekularer Hyaluronsäure in Eppendorfküvetten gefüllt und mit jeweils 50µl M2 (Lösungsmittel der Hyaluronidase) bzw. unbehandelter und hitzebehandelter (95°C für 60 Minuten und 70°C für 30 Minuten) Hyaluronidase [1mg/ml] inkubiert. Da beim Abbau der Hyaluronsäure geht die hohe Viskosität verloren geht, war die Hyaluronidaseaktivität an der Verflüssigung der Hyaluronsäure zu erkennen. Als Referenz wurde eine wässrige Lösung aus 50µl M2 und 500µl Aqua ad iniectabilia angesetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 24 Stunden, 14 Stunden bei 22°C und 10 Stunden bei 4°C. Durch das Kippen der Eppendorfgefäße um ca. 90° wurde die Viskosität abgeschätzt.



I: Hyaluronsäure (HyGAG™)+M2;

II: Hyaluronsäure+Hyaluronidase  
[1mg/ml] 95°C 60min;

III: Hyaluronsäure+Hyaluronidase  
[1mg/ml] 70°C 30min;

IV: Hyaluronsäure+Hyaluronidase  
[1mg/ml] unbehandelt;

V: Aqua ad iniectabilia+M2;

Hyaluronidase in M2 gelöst.

**Abb. 11 b Viskositätsabschätzung nach 24 Stunden Inkubation (14 Stunden bei 22°C, 10 Stunden bei 4°C) nach Inkubation hochmolekularer Hyaluronsäure mit unbehandelter und hitzebehandelter Hyaluronidase**

In der Abbildung ist der Flüssigkeitsspiegel als Ausdruck der Viskosität dargestellt. Es zeigt sich in den Gefäßen III, IV und V ein durchgehender Spiegel (Pfeile), während dieser in Gefäß I und II abbricht (Pfeil). Die Viskosität in Gefäß II deutet darauf hin, dass die Hyaluronsäure nicht abgebaut wurde. Somit war die Hyaluronidase offensichtlich nicht mehr aktiv. Der Flüssigkeitsspiegel in Gefäß III und IV zeigt, dass die Hyaluronsäure abgebaut wurde und somit die Hyaluronidase aktiv war. Für die Hyaluronidase-Inaktivierung reichte die Hitzebehandlung bei 70°C für 30 Minuten nicht aus, während die Hitzebehandlung bei 95°C für 60 Minuten ausreichend war. In Zusammenschau mit dem vorhergehenden Versuch ist zu erkennen, dass Heparin einen Effekt hat, der über die Inaktivierung der Hyaluronidase hinausgeht, da der Effekt der enzym-inaktivierten Hyaluronidase (95°C, 60 Minuten) durch Heparin unterdrückt wurde.

In einem weiteren Versuch sollte der Viskositätsunterschied zumindest grob quantitativ erfasst werden. So wurden die Proben der Eppendorfgefäße entsprechend der Beschreibung im Kapitel „Material und Methoden“ (Abschnitt 3.2.5)

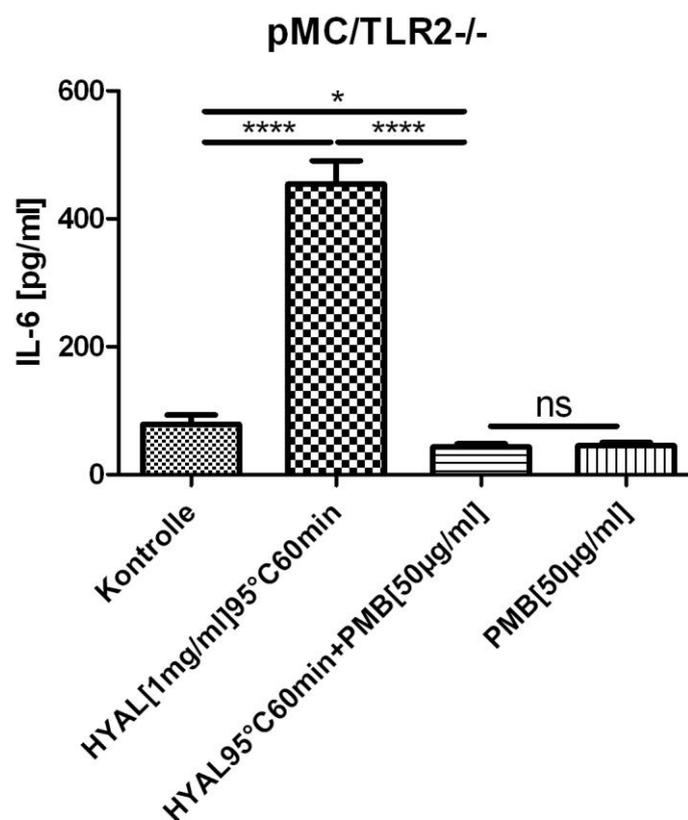
mittels Flussgeschwindigkeit in einer Pipette (Kapillarflussgeschwindigkeit) untersucht.

**Tabelle 5: Viskositätsvergleich durch Messung der Flussgeschwindigkeit in einer Pipette**

	Benötigte Zeit in [s] für das Zurücklegen von 1,45 cm in der Pipette	
	Mittelwert	Standardabweichung
Hyaluronsäure (HyGAG)+M2	12,84	1,3
HyGAG+Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C, 60 min	12,71	0,82
HyGAG+Hyaluronidase [1mg/ml] 70°C, 30 min	nicht messbar, <<1s	
HyGAG+Hyaluronidase [1mg/ml]	nicht messbar, <<1s	
Aqua ad iniectabilia+M2	nicht messbar, <<1s	

Die Messung der Flussgeschwindigkeit gibt dimensionsmäßig einen Anhalt, ist also nur richtungsweisend für einen Unterschied in der Viskosität. Der Unterschied von HyGAG und HyGAG plus [Hyaluronidase 95°C, 60 min] gegenüber Aqua, HyGAG plus [Hyaluronidase unbehandelt] und HyGAG plus [Hyaluronidase 70°C, 30 min] ist wichtig. Die gute Übereinstimmung von HyGAG und HyGAG plus Hyaluronidase 95°C, 60 min ist, bedingt durch die Ungenauigkeit der Methode, eher als zufällig zu betrachten. Das Ergebnis der visuellen Abschätzung im Eppendorfgefäß, dass Hyaluronidase erst bei einer Erwärmung auf 95°C für 60 Minuten inaktiviert wird, wird durch die Messung der Flussgeschwindigkeit untermauert. Das Ergebnis ist relevant für die Untersuchung der Hyaluronidase in der Zellkultur. Die Inkubation mit bei 95°C für 60 Minuten behandelte Hyaluronidase führte, wie gezeigt zu einer deutlichen IL-6-Expression der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen. Somit konnte die Hyaluronidasewirkung für den stimulierenden Effekt am TLR4 ausgeschlossen werden. Die alleinige Enzymwirkung der Hyaluronidase hatte somit weder an den pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen noch an den pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen einen Effekt. Somit konnte gleichfalls ausgeschlossen werden, dass Hyaluronsäure einer durch die Hyaluronidase generierten Molekülmasse einen intrinsischen Effekt an einem Rezeptor hatte, dessen Stimulation zu einer IL-6-Expression führt.

Da die Hyaluronidase nach Verlust der Enzymaktivität weiterhin zur Stimulation des TLR4 geführt hatte, sollte die Co-Inkubation der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen mit inaktivierter Hyaluronidase und Polymyxin B einen Hinweis darauf bringen, ob eine Kontamination der Hyaluronidase mit LPS vorlag, welche die Rezeptorstimulation bedingte. Die Untersuchung erfolgte wieder an pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen. Verglichen wurde die IL-6-Expression durch hitzebehandelte Hyaluronidase [1mg/ml] (95°C, 60 Minuten) alleine und in Co-Inkubation mit Polymyxin B [50µg/ml]. Als Kontrolle diente in diesem Fall zusätzlich die Inkubation mit Polymyxin B [50µg/ml] alleine. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.

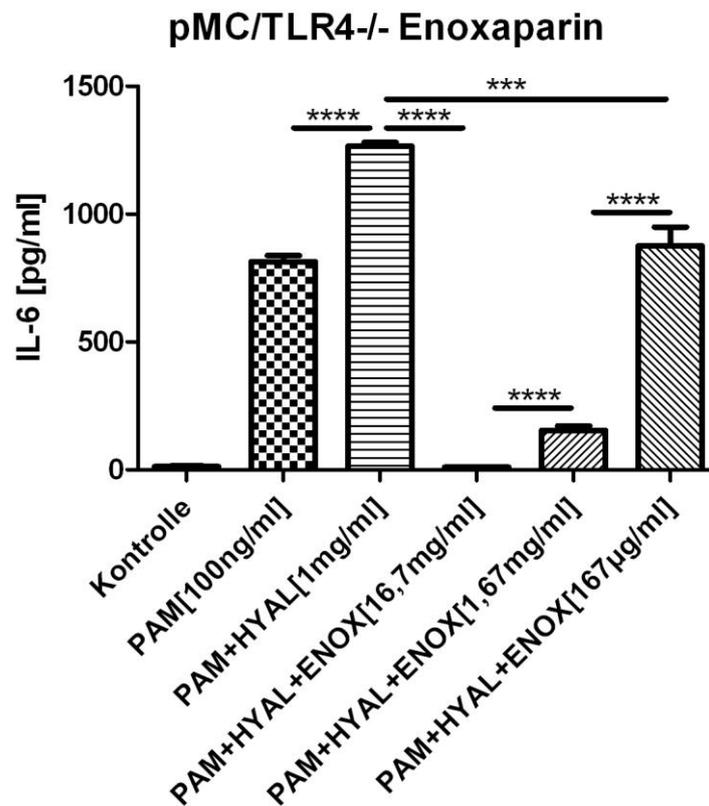


**Abb. 11 c Co-Inkubation der hitzeinaktivierten Hyaluronidase mit Polymyxin B**

Die durch die enzyminaktivierte Hyaluronidase (95°C, 60 min) bedingte IL-6-Expression der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen konnte durch Polymyxin B unterdrückt werden und war somit als LPS-bedingt zu werten. Die Hyaluronidase war folglich LPS-kontaminiert.

### 4.2.3 Der Einfluss von Heparinen

Heparin ist als Inaktivator der Hyaluronidase bekannt. So sollte untersucht werden, wie sich die gleichzeitige Inkubation mit Hyaluronidase und Heparin auf die durch die TLR-Liganden bedingte IL-6-Expression der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen und pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen auswirkt. Dafür wurden die pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen mit PAM3CysSK4 [100ng/ml] alleine und in Kombination mit Hyaluronidase [1mg/ml] inkubiert. Zusätzlich wurden in einem Versuch kombinierte Inkubationen mit Enoxaparin der Konzentration [16,7mg/ml] und den Verdünnungen 1:10 ([1,67mg/ml]) und 1:100 ([167µg/ml]), in einem weiteren Versuch mit Heparin der Konzentration [4167I.E./ml] und den Verdünnungen 1:10 ([416,7I.E.]) und 1:100 ([41,67I.E.]) inkubiert. Ein analoger Versuch lief mit pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen ab, wobei hier jeweils statt PAM3CysSK4 LPS in der Konzentration [100ng/ml] eingesetzt wurde. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



**Abb. 12 a-1 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Enoxaparin (LMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR4<sup>-/-</sup> Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und PAM3CysSK4 [100mg/ml]**

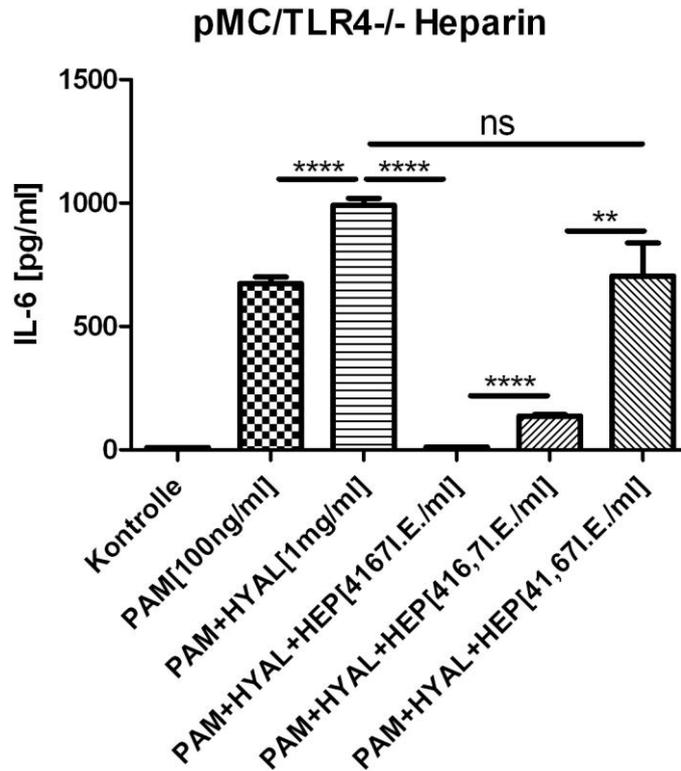


Abb. 12 a-2 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Heparin (HMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR4-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und PAM3CysSK4 [100mg/ml]

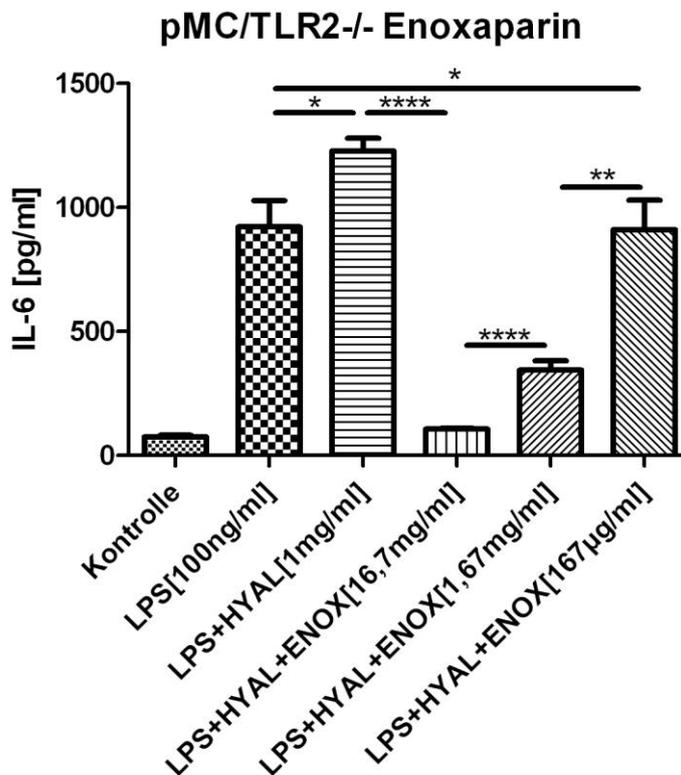
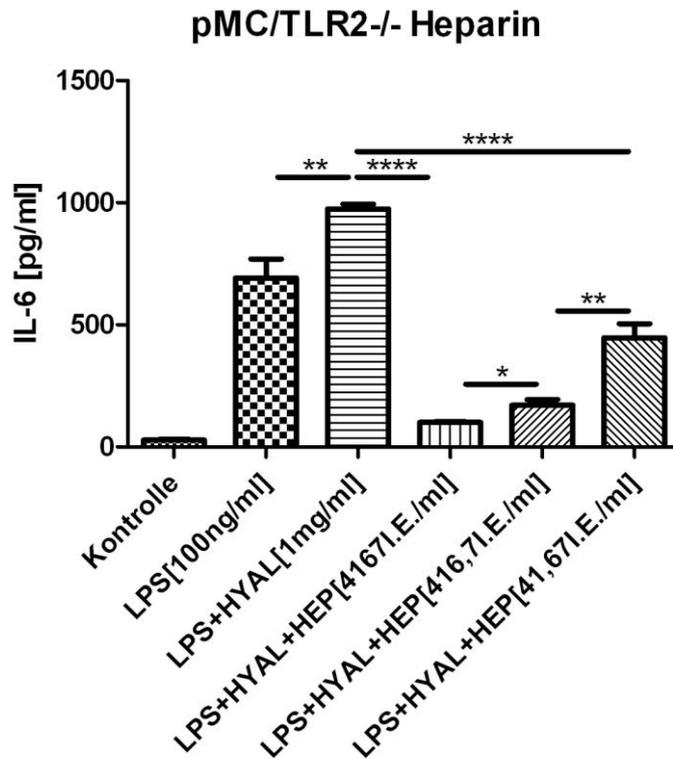


Abb. 12 b-1 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Enoxaparin (LMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR2-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und LPS [100mg/ml]



**Abb. 12 b-2 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Heparin (HMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR2<sup>-/-</sup> Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und LPS [100mg/ml]**

Die durch die TLR-Liganden in Kombination mit Hyaluronidase bedingte IL-6-Expression der Mesangialzellen wurde durch Heparin konzentrationsabhängig unterdrückt. Die Unterdrückung war gleichförmig für hochmolekulares Heparin (Heparin) und niedermolekulares Heparin (repräsentiert durch Enoxaparin) und nahm mit abnehmender Konzentration ab. Das galt sowohl für die pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen als auch für die pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen. Als Antagonist der Hyaluronidase war zu erwarten gewesen, dass Heparin den Unterschied zwischen der IL-6-Expression bei Inkubation mit dem TLR-Liganden mit und ohne Hyaluronidase ausgleicht. In hoher Konzentration wurde durch Heparin nicht nur der Unterschied ausgeglichen, sondern das Niveau der IL-6-Expression weit darüber hinaus in den Bereich der Kontrolle gesenkt. Die Betrachtung von Heparin als Hyaluronsäureantagonist ist zumindest zu dahingehend zu modifizieren, dass ein darüber hinausgehender Effekt existiert. Einen Hinweis darauf, dass Heparin einen Effekt hat, welcher über die Inhibition der Hyaluronidase hinausgeht, hatte die Untersuchung der Hyaluronidase mit pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen ergeben. Der Effekt der inaktivierten Hyaluronidase wurde durch Heparin weitgehend unterdrückt. Zusammenfassend ist der supprimierende und

konzentrationsabhängige Effekt sowohl durch Heparin als auch durch Enoxaparin unspezifisch.

Um zu ermitteln, ob sich der Hyaluronidaseeffekt auf weitere Toll-like-Rezeptoren erstreckt, wurden der Oberflächenrezeptor TLR5 und der intrazelluläre TLR3 mit untersucht. Als spezifischer TLR5-Ligand wurde Flagellin verwendet, als spezifischer TLR3-Ligand kam Poly(I:C) zum Einsatz. Wegen der LPS-Kontamination wurden die Untersuchungen an den pMC/TLR4-/- Zellen durchgeführt, da Hyaluronidase für diese Zellen keinen stimulierenden Effekt gezeigt hatte. Somit wurde sichergestellt, dass die Resultate der Untersuchung des TLR3 und TLR5 nicht durch die LPS-Kontamination beeinflusst wurden. Die gleichzeitige Präsenz eines TLR4 bei spezifischer Stimulation des TLR3 bzw. TLR5 wurde als nicht relevant erachtet.

#### 4.2.4 Stimulation mit Flagellin

Zunächst sollte ermittelt werden, in welcher Konzentration Hyaluronidase eingesetzt werden muss, um einen zweifelsfreien Effekt zu erkennen. Dafür wurde Flagellin in der Konzentration [200ng/ml] alleine und zusammen mit Hyaluronidase der Konzentrationen [50µg/ml], [300µg/ml] und [1mg/ml] verwendet. Wie bereits erwähnt kamen pMC/TLR4-/- Zellen zum Einsatz. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.

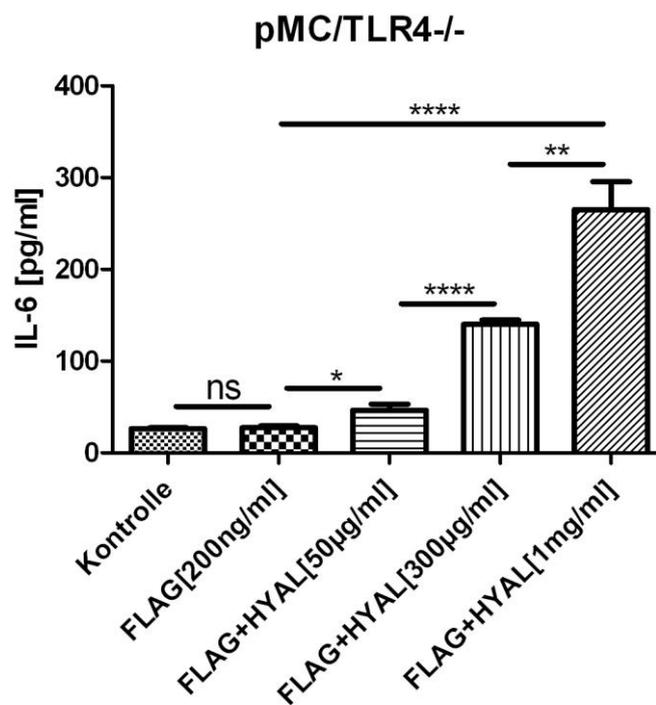
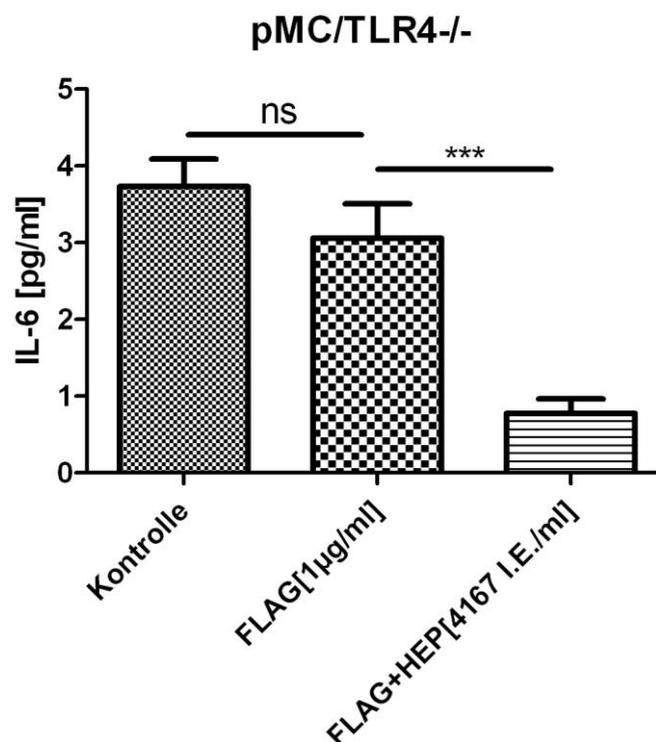


Abb. 13 a Verdünnungsreihe Hyaluronidase bei Co-Inkubation mit Flagellin (pMC/TLR4-/- Zellen)

Bei gleichbleibender Flagellinkonzentration stieg bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase mit zunehmender Hyaluronidasekonzentration die induzierte IL-6-Expression der pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen. Die alleinige Stimulation mit Flagellin [200ng/ml] führte zu einer IL-6-Expression auf dem Niveau der Kontrolle. Der deutlichste und zweifelsfreie Effekt durch Hyaluronidase zeigte sich bei einer Hyaluronidasekonzentration von [1mg/ml]. Weitere Untersuchungen wurden aus diesem Grund mit einer Hyaluronidasekonzentration von [1mg/ml] durchgeführt.

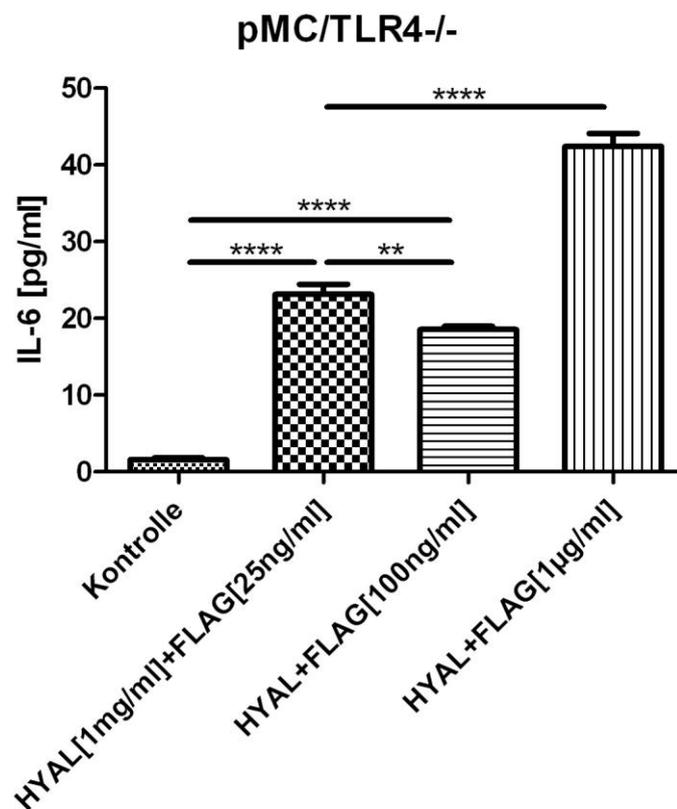
Zunächst wurde das Absprechen der pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen auf Flagellin untersucht. Flagellin wurde in einer Konzentration von [1µg/ml] eingesetzt. Gleichzeitig sollte eine mögliche Hemmung durch Heparin, angewandt in einer Konzentration von [4167I.E./ml], untersucht werden. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



**Abb. 13 b-1 Flagellin [1µg/ml] ohne Hyaluronidase (pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen)**

Die alleinige Inkubation mit Flagellin einer Konzentration von [1µg/ml] führte zu einer IL-6-Expression der pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen auf dem Niveau der Kontrolle. Die weitere Hemmung durch Heparin auf dem Niveau der Kontrolle war auf diesem Niveau nur als Hinweis verwertbar. Festzuhalten ist, dass durch Flagellin bis zu einer

Konzentration von [1µg/ml] keine IL-6-Expression über dem Niveau der Kontrolle erreicht werden konnte, womit diese Konzentration nicht zur Stimulation des TLR5 der pMC/TLR4-/- Zellen genügte. Daraufhin wurden pMC/TLR4-/- Zellen mit Hyaluronidase [1mg/ml] und Flagellin der Konzentrationen [25ng/ml], [100ng/ml] und [1µg/ml] co-inkubiert. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



**Abb. 13 b-2 Verdünnungsreihe Flagellin bis [1µg/ml] mit Hyaluronidase [1mg/ml] (pMC/TLR4-/- Zellen)**

Bei Co-Inkubation mit gleichbleibender Konzentration der Hyaluronidase und unterschiedlichen Konzentrationen des Flagellins zeigte sich für alle Konzentrationen eine IL-6-Expression über dem Niveau der Kontrolle. Die IL-6-Expression der pMC/TLR4-/- Zellen mit Zunahme der Flagellinkonzentration tendenziell zu. Da, wie gezeigt, Flagellin alleine bis zu [1µg/ml] auf dem Niveau der Kontrolle lag, wurde gefolgert, dass bis zu einer Flagellinkonzentration von [1µg/ml] eine IL-6-Expression der pMC/TLR4-/- Zellen erst durch Hyaluronidase ermöglicht wurde. Bei Zugabe von Hyaluronidase nahm die IL-6-Expression jedoch mit zunehmender Konzentration des Flagellins zu.

#### 4.2.5 Stimulation mit Poly(I:C)

Auch die Untersuchung des TLR3 wurde mit Hilfe von pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen durchgeführt. Da Hyaluronidase in der Konzentration [1mg/ml] bei der Untersuchung von TLR2, TLR4 und TLR5 einen zweifelsfreien Effekt hatten, wurde diese Dosierung auch für die Testung des TLR3 verwendet. Untersucht wurde Unterschied der IL-6-Expression im Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen vom Poly(I:C) mit und ohne Hyaluronidase [1mg/ml]. Poly(I:C) wurde dabei in den Konzentrationen [1ng/ml], [10ng/ml], [100ng/ml], [1µg/ml] und [10µg/ml] verwendet. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.

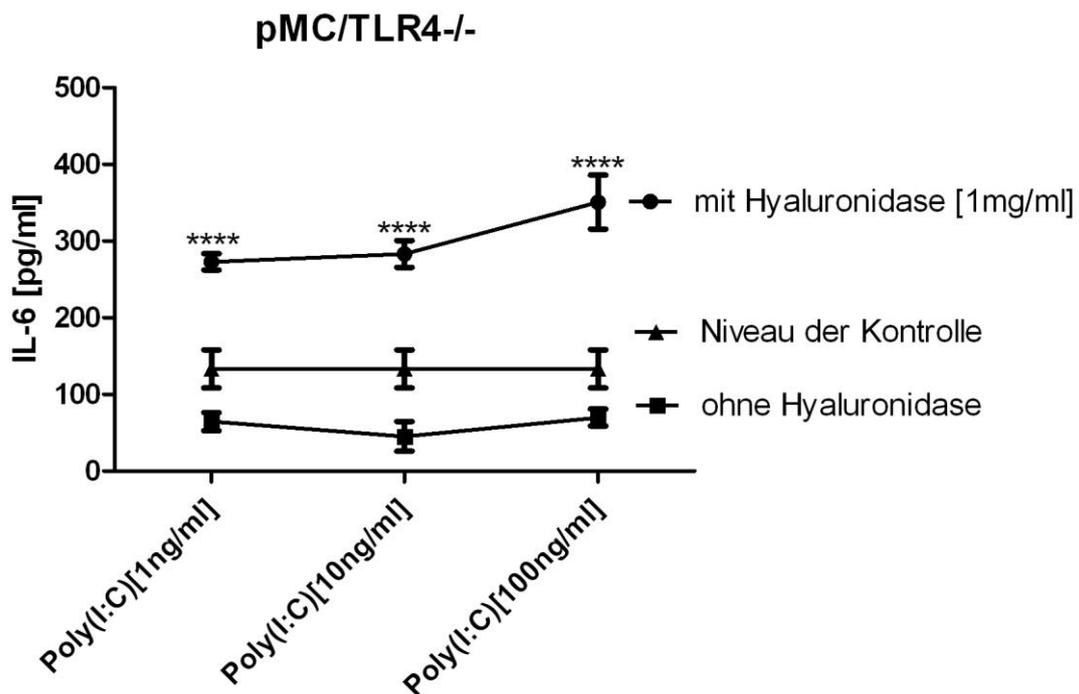
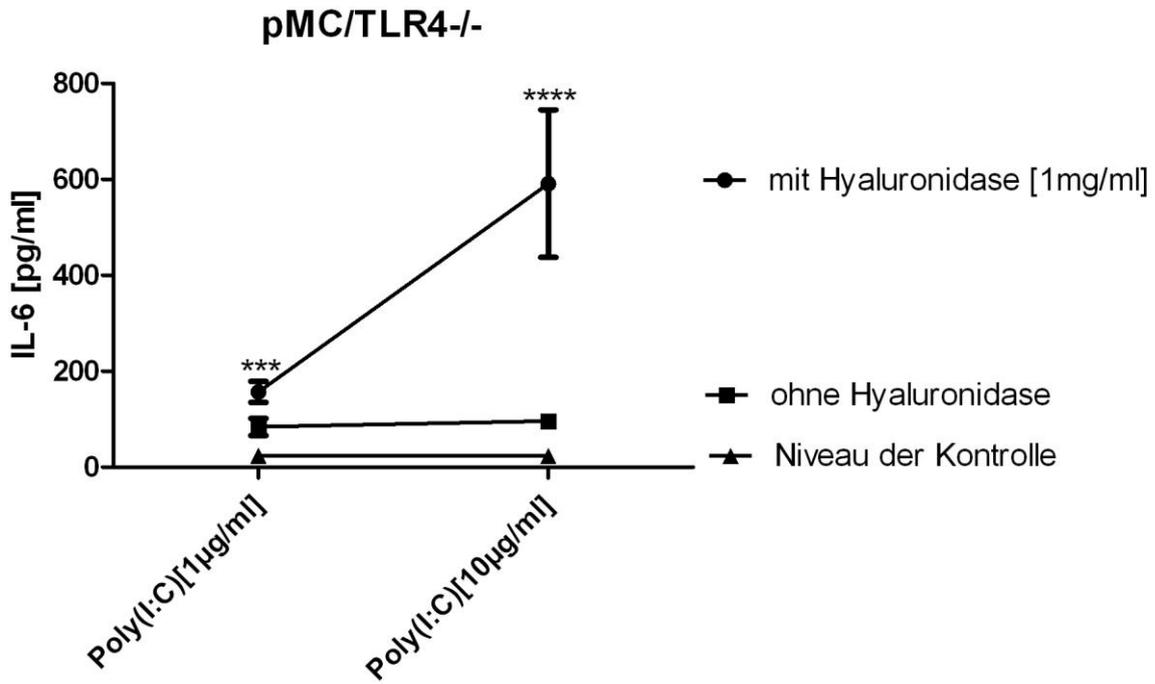


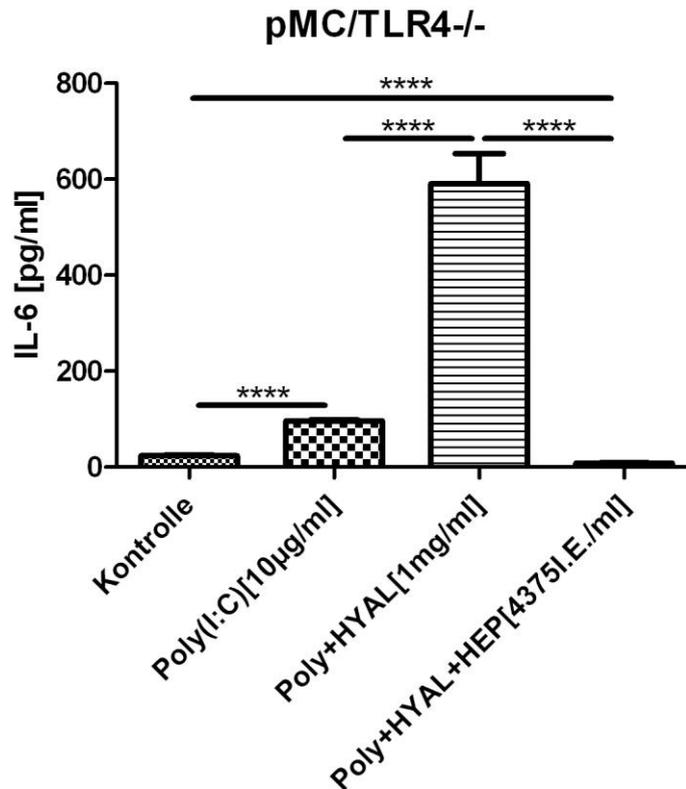
Abb. 14 a-1 Verdünnungsreihe Poly(I:C) mit und ohne Hyaluronidase [1mg/ml] (pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen) (I)



**Abb. 14 a-2 Verdünnungsreihe Poly(I:C) mit und ohne Hyaluronidase [1mg/ml] (pMC/TLR4-/- Zellen) (II)**

Die Co-Inkubation von Hyaluronidase in gleichbleibender Konzentration [1mg/ml] und unterschiedlichen Konzentrationen von Poly(I:C) führte zu einer höheren IL-6-Expression der pMC/TLR4-/- Zellen als die Stimulation mit Poly(I:C) alleine. Die Unterschiede waren jeweils statistisch signifikant. Mit Hyaluronidase ergab sich eine steigende Tendenz der IL-6-Werte bei zunehmenden Poly(I:C)-Konzentrationen, während ohne Hyaluronidase diese Tendenz nicht zu beobachten war.

Nachdem Heparin einen sicheren Effekt auf die Stimulation von TLR2, TLR4 hatte und auch auf den TLR5 einen Einfluss zeigte, sollte der Einfluss von Heparin auf den TLR3 untersucht werden. Dafür wurden pMC/TLR4-/- Zellen mit Poly(I:C) [10µg/ml] alleine, in Kombination mit Hyaluronidase [1mg/ml] sowie zusätzlich mit Heparin [4375I.E./ml] inkubiert. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



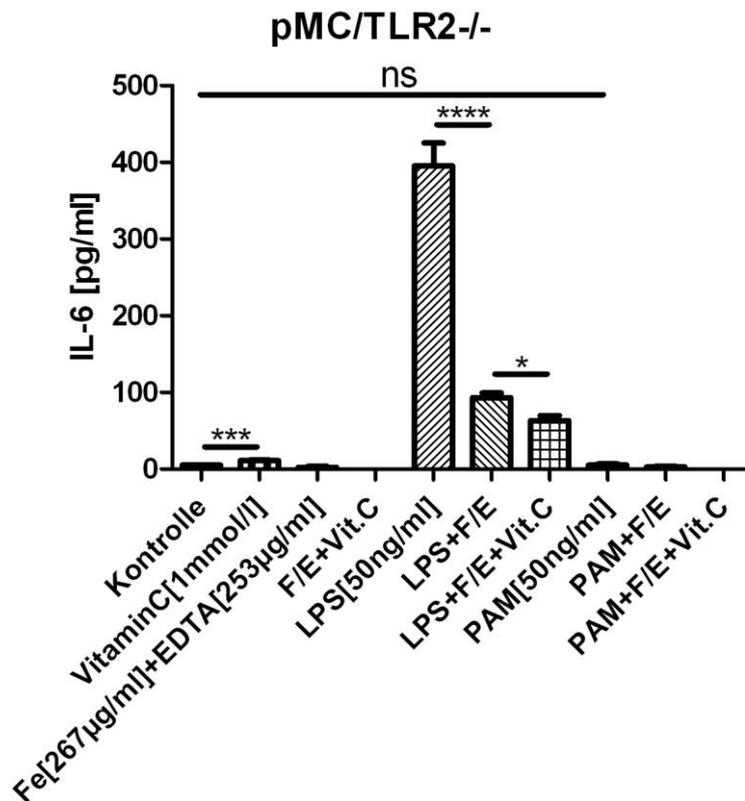
**Abb. 14 b** Einfluss von Heparin (HMW-Heparin) auf die die IL-6-Expression von pMC-TLR4-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und Poly(I:C) [10µg/ml]; Poly = Poly(I:C)

Die durch die Kombination von Poly(I:C) und Hyaluronidase bedingte IL-6-Expression der pMC-TLR4-/- Zellen ließ sich durch Heparin vollständig unterdrücken. Bei dieser Heparin-Konzentration wurde nicht nur der Unterschied zwischen der IL-6-Expression bei Inkubation mit Poly(I:C) mit und ohne Hyaluronidase ausgeglichen, sondern das Niveau der IL-6-Expression darüber hinaus in den Bereich der Kontrolle gesenkt. Der Heparineffekt war somit unspezifisch und für alle untersuchten Toll-like-Rezeptoren in ähnlicher Weise vorhanden.

#### **4.2.6 Der Einfluss von Radikalen (System aus FeSO<sub>4</sub> und EDTA)**

Als Abbauweg der Hyaluronsäure ist neben der enzymatischen Spaltung durch Hyaluronidase auch die Spaltung des Moleküls durch Radikale bekannt ist. Entsprechend den Untersuchungen von McNeil et al. (1989) wurde das System aus FeSO<sub>4</sub> und EDTA in äquimolaren Mengen als Radikalbildner verwendet. Untersucht wurden pMC-TLR2-/- Zellen und pMC-TLR4-/- Zellen. Beide Zelltypen wurden jeweils mit LPS [50ng/ml] und Pam3CysSK4 [50ng/ml] untersucht. Die Kombination aus FeSO<sub>4</sub> [267µg/ml] und EDTA [253µg/ml] sowie Vitamin C (Ascorbinsäure) [1mmol/ml]

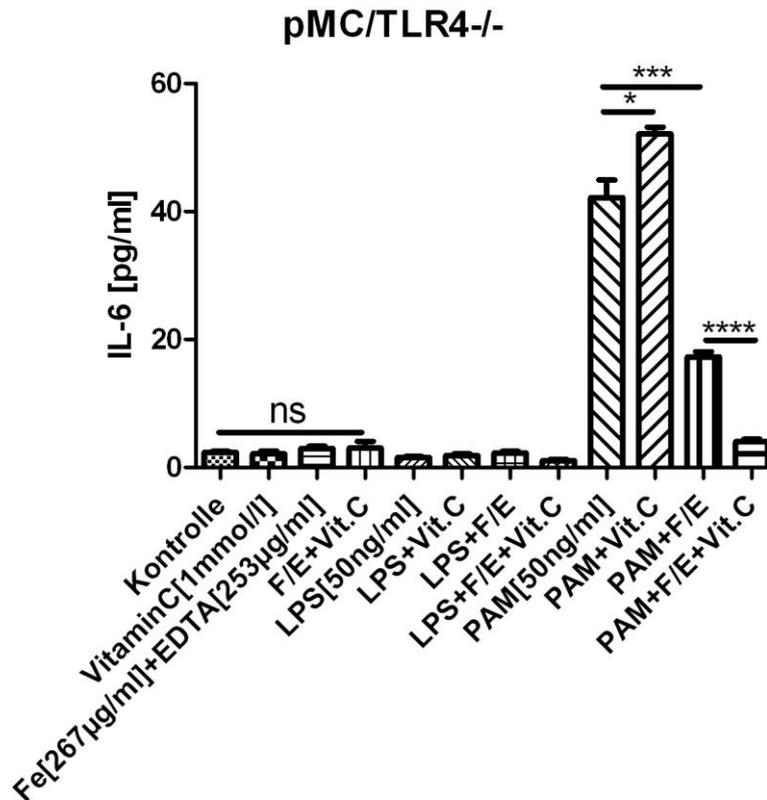
wurden alleine und kombiniert untersucht. Zudem wurden die TLR-Liganden mit dem FeSO<sub>4</sub>-EDTA-System mit und ohne Vitamin C co-inkubiert. Für jeden Ansatz wurden jeweils 2 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



**Abb. 15 a-1 Einfluss des FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Systems auf pMC/TLR2-/- Zellen**

Ohne LPS zeigte alleine die Inkubation mit Vitamin C formell eine statistisch signifikante Erhöhung der IL-6-Expression über jene der Kontrolle hinaus, wobei das Niveau in etwa dasselbe blieb. Das FeSO<sub>4</sub>-EDTA-System verminderte die durch LPS bedingte IL-6-Expression der pMC/TLR2-/- Zellen. Bei Abbau der Hyaluronsäure durch Radikale wäre, entsprechend dem Abbau durch Hyaluronsäure, eine Verstärkung der LPS-bedingten IL-6-Expression zu erwarten gewesen.

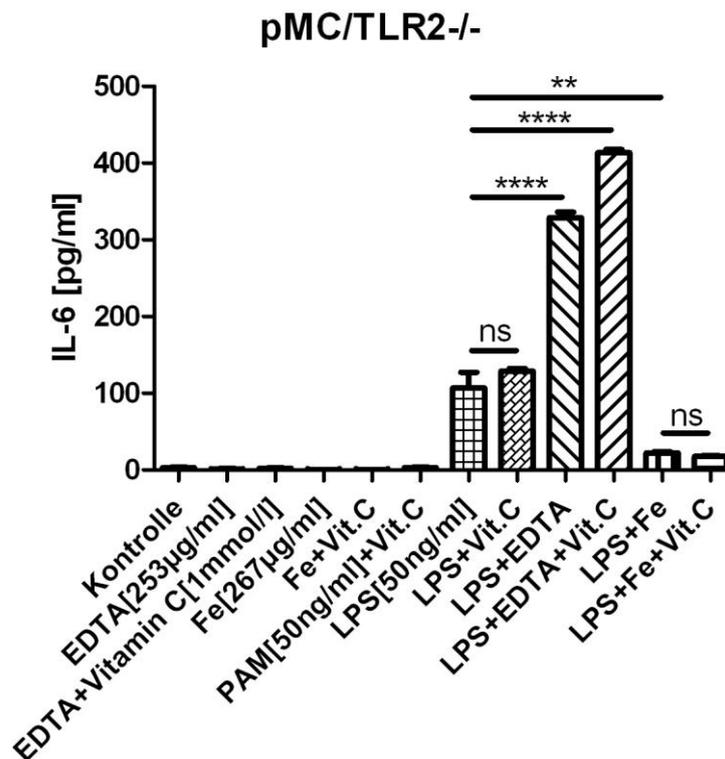
Die Inkubation der pMC/TLR4-/- Zellen wurde zusätzlich mit der Kombination aus dem TLR-Liganden und Vitamin C durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden jeweils 2 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



**Abb. 15 a-2 Einfluss des FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Systems auf pMC/TLR4-/- Zellen**

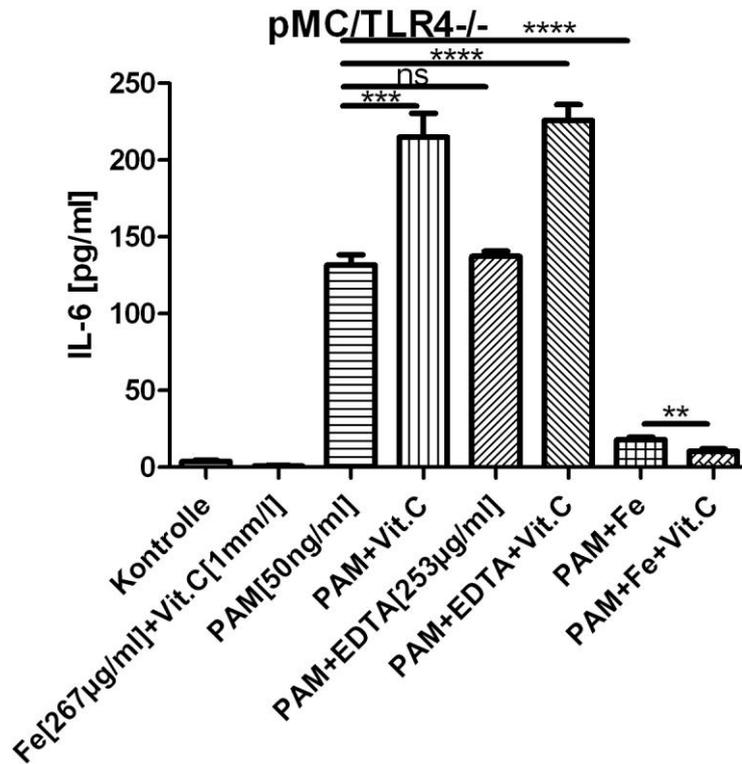
Ohne PAM3CysSK4 konnte keine IL-6-Expression über dem Niveau der Kontrolle erzielt werden, so dass keine intrinsische Aktivität des Vitamin C und des FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Systems bestand, weder alleine noch in Kombination. Das FeSO<sub>4</sub>-EDTA-System verminderte die durch PAM3CysSK4 bedingte IL-6-Expression der pMC/TLR4-/- Zellen. Dieser Effekt wurde durch Vitamin C nochmals verstärkt. Vitamin C verstärkte die durch PAM3CysSK4 bedingte IL-6-Expression.

Nachdem das FeSO<sub>4</sub>-EDTA-System die Stimulation des TLR2 durch PAM3CysSK4 sowie das TLR4 durch LPS abschwächte, während Hyaluronidase den gegenteiligen Effekt hatte, bot sich die Analyse des FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Systems an. So wurden die Zellen mit den einzelnen Komponenten, also mit FeSO<sub>4</sub> und EDTA getrennt von einander inkubiert. Dabei wurden sowohl FeSO<sub>4</sub> als auch EDTA alleine und in Kombination mit Vitamin C und oder den spezifischen TLR-Liganden untersucht. Die Konzentrationen der Substanzen blieben dabei gegenüber dem vorhergehenden Versuch unverändert. Für jeden Ansatz wurden jeweils 2 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



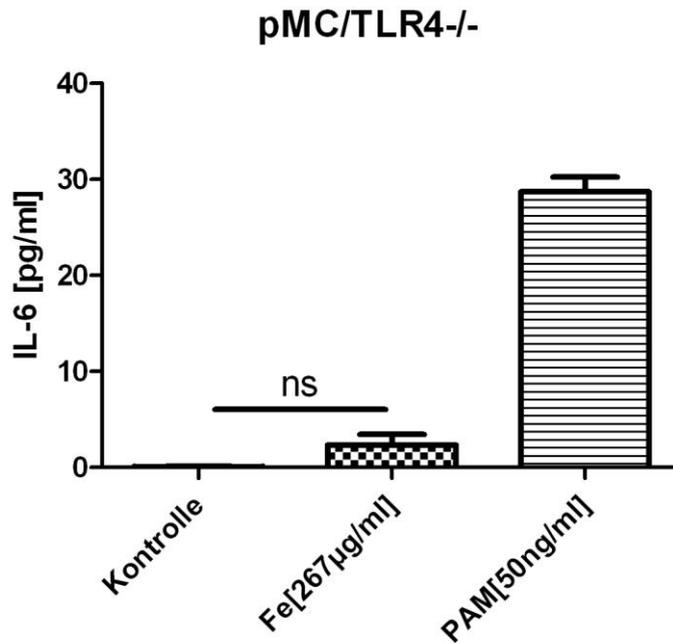
**Abb. 15 b-1 FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Analyse (pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen)**

Die Analyse des FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Systems zeigte, dass FeSO<sub>4</sub> die IL-6-Expression der pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen durch LPS signifikant reduziert, während EDTA sie signifikant verstärkt. Die Verstärkung der IL-6-Expression durch Vitamin C war für die Kombination von LPS und EDTA signifikant, während sie für LPS alleine nur tendenziell war. FeSO<sub>4</sub>, und EDTA hatten keinen intrinsischen Effekt, weder alleine, noch in Kombination mit Vitamin C. Die Werte der IL-6-Expression lagen hierfür unter dem Niveau der Kontrolle. Die Inkubation mit PAM3CysSK4 alleine oder in Kombination hatte keinen stimulierenden Effekt, so dass die analoge Untersuchung der pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen nur noch den TLR2-Liganden beinhaltete, während auf den TLR4-Liganden verzichtet wurde. Für jeden Ansatz wurden jeweils 2 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



**Abb. 15 b-2 FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Analyse (pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen) (I)**

Die Analyse des FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Systems zeigte, dass FeSO<sub>4</sub> die IL-6-Expression der pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen durch PAM3CysSK4 vermindert. Der verminderte Effekt wurde durch Vitamin C verstärkt. EDTA in Kombination mit PAM3CysSK4 führte nicht zu einer signifikanten Änderung der IL-6-Expression, während die weitere Zugabe von Vitamin C die IL-6-Expression erhöhte. Der gleiche Effekt wurde für die Zugabe von Vitamin C zu PAM3CysSK4 beobachtet. Aus Gründen der Vollständigkeit war noch der Effekt der isolierten FeSO<sub>4</sub>-Stimulation [267µg/ml] auf die IL-6-Expression der pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen zu untersuchen. PAM3CysSK4 [50µg/ml] diente als Positivkontrolle. Für jeden Ansatz wurden jeweils 3 „wells“ der Zellkulturplatte beimpft, welche doppelt ausgewertet wurden.



**Abb. 15 b-3 FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Analyse (pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen) (II)**

Die IL-6-Expression durch FeSO<sub>4</sub> lag nicht signifikant über jener der Kontrolle. Somit hatten FeSO<sub>4</sub>, EDTA und Vitamin C, weder alleine, eine intrinsische Aktivität, auch wenn bei Inkubation mit Vitamin C formell die IL-6-Expression gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht war. Konsistent für beide Zelltypen war die Verminderung der IL-6-Expression bei Co-Inkubation der spezifischen TLR-Liganden mit FeSO<sub>4</sub> sowie die Erhöhung durch die Kombination von Vitamin C und EDTA, während für Vitamin C nur die Verstärkung der Wirkung der spezifischen Liganden am TLR2 und für EDTA am TLR4 signifikant war.

Nachdem durch FeSO<sub>4</sub> die Wirkung der TLR-Liganden an ihrem TLR vermindert wurde, sollte ein Hinweis für die Wirkung von FeSO<sub>4</sub> auf die Hyaluronsäure gefunden werden. Dafür wurde hochmolekulare Hyaluronsäure in einem Eppendorfgefäß mit FeSO<sub>4</sub> inkubiert. Da das FeSO<sub>4</sub> in NaCl 0,9% gelöst war, diente die Inkubation von Hyaluronsäure mit 0,9% NaCl der Kontrolle. Die Viskosität sollte einen Anhalt dafür bieten, ob Hyaluronsäure durch FeSO<sub>4</sub> abgebaut wird. Im Falle des Abbaus der Hyaluronsäure durch FeSO<sub>4</sub> musste die Viskosität abnehmen. Als Referenz wurde eine wässrige Lösung zubereitet. Die Inkubationszeit betrug 10 Tage bei unterschiedlichen Temperaturen (22°C und 4°C) zu etwa gleichen Teilen. Zur Auswertung wurden die Gefäße zuerst um ca. 90° gekippt, danach darüber hinaus.

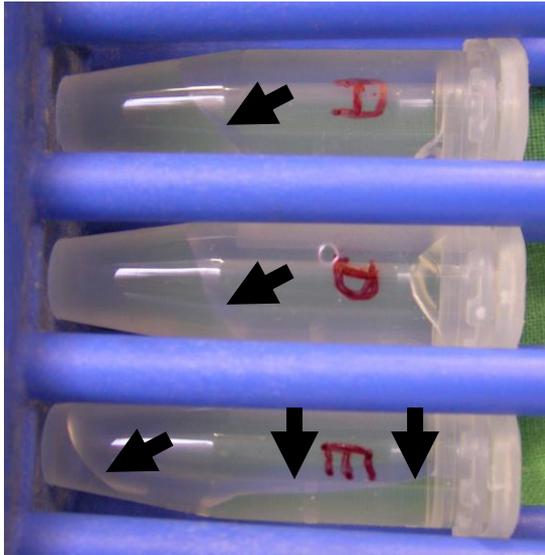


Abb. 15 c-1

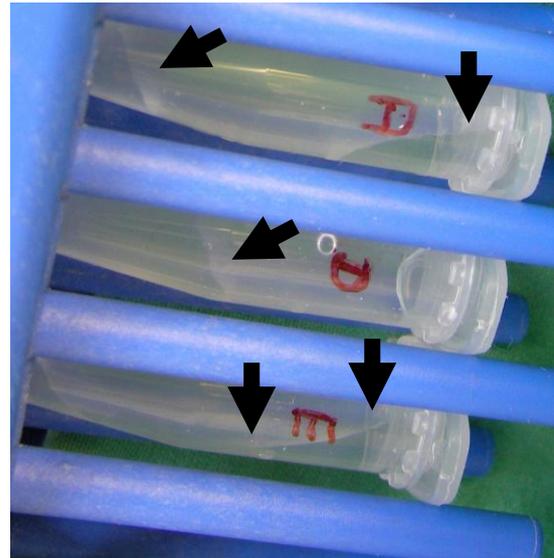


Abb. 15 c-2

**Abschätzung der Viskosität nach Inkubation hochvisköser Hyaluronsäure mit  $\text{FeSO}_4$  für 10 Tage**

- A: 500 $\mu\text{l}$  Hyaluronsäure (HyGAG™)+100 $\mu\text{l}$  NaCl 0,9%
- D: 500 $\mu\text{l}$  Hyaluronsäure +50 $\mu\text{l}$   $\text{FeSO}_4$  [1,52mg/ml]+50 $\mu\text{l}$  NaCl 0,9%
- E: 500 $\mu\text{l}$  NaCl 0,9%+50 $\mu\text{l}$   $\text{FeSO}_4$  [1,52mg/ml]+ 50 $\mu\text{l}$  EDTA [1,6mg/ml].

In den Abbildungen ist der Flüssigkeitsspiegel als Ausdruck der Viskosität dargestellt. Gefäß A zeigt die Viskosität der Hyaluronsäure. Gefäß E diente als Referenz für den flüssigen Zustand. Gefäß E zeigt in beiden Abbildungen einen deutlichen Flüssigkeitsspiegel (Pfeile). Auch in Gefäß A ist in der rechten Abbildung ein deutlicher Flüssigkeitsspiegel zu erkennen (Pfeile), während in Gefäß D in beiden Abbildungen und Gefäß A in der linken Abbildung die Flüssigkeit nur zäh floss (jeweils nur ein Pfeil). In Gefäß D war die Viskosität zumindest nicht geringer, tendenziell sogar höher als in Gefäß A. Das deutet auf einen stabilisierenden Effekt des  $\text{FeSO}_4$  auf die Hyaluronsäure hin. Auf Grund des Radikalbildungsvermögens des  $\text{FeSO}_4$  war über den Abbau der Hyaluronsäure durch Radikale, in Analogie zur Wirkung der Hyaluronsäure, mit einer Verstärkung der TLR-Liganden-Wirkung am Rezeptor zu rechnen. Da  $\text{FeSO}_4$  entgegen dem erwarteten Effekt zu einer Stabilisation der Hyaluronsäure geführt hat, erklärt sich der Effekt der geringeren IL-6-Expression bei Co-Inkubation mit einem TLR-Liganden, während bei einem Abbau der Hyaluronsäure, entsprechend den Ergebnissen mit Hyaluronidase, ein Anstieg der IL-6-Expression zu erwarten gewesen wäre.

## 5 Diskussion

Die vorliegende Untersuchung sollte zur Klärung der Frage dienen, ob Hyaluronsäure entsprechend Termeer et al. (2002) einen Liganden des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4), entsprechend Scheibner et al. (2006) einen Liganden des TLR2 oder entsprechend Jiang et al. (2011) einen Liganden beider Rezeptoren darstellt. Scheibner et al. (2006) hatten in ihrer Publikation darauf hingewiesen, dass die Schlussfolgerung Hyaluronsäure sei ein TLR4-Ligand auf einer möglichen Verunreinigung verwendeter Substanzen mit LPS (Lipopolysaccharid), einem TLR4-Liganden, beruhen könnte. Für diese Entscheidung war eine Untersuchung an Knockout-Zellen für den TLR2 bzw. den TLR4 sinnvoll.

In der vorliegenden Untersuchung sollte ein einfaches und robustes Testsystem verwendet werden. Als solches wurde der IL-6-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), auf der Grundlage, dass bei Stimulation mit TLR2 und TLR4 bei ungestörter Signalkaskade IL-6 durch die Zelle produziert wird (Patole et al., 2006), angesehen. Die Verwendung von Mesangialzellen für die Untersuchung schränkt eine Verallgemeinerung der Resultate ein. Es wurde jedoch davon ausgegangen, dass die grundlegende Interaktion zwischen dem TLR und seinem spezifischen Liganden sich nicht wesentlich von anderen Zellen des Organismus unterscheidet. Nach Bestätigung der Spezifität des Knockout-Status der Zellen, zeigte sich, dass in einer Größenordnung bis zu 3000Da Hyaluronsäure weder eine intrinsische Aktivität aufwies noch als Vermittler der Bindung von LPS (TLR4-Ligand; Lim et al., 2011) oder PAM3CysSK4 (TLR2-Ligand; van Maren et al., 2011) an einem Rezeptor fungierte, dessen nach geschalteter Signalweg zur Expression von IL-6 führt. Eine blockierende Wirkung am Rezeptor konnte gleichfalls ausgeschlossen werden. Im Rahmen der weiteren Untersuchungen konnte auch der Verdacht ausgeräumt werden, Hyaluronsäure könnte einen geringgradig verstärkenden Effekt am TLR2 für seinen spezifischen Liganden haben. Geht man davon aus, dass die Bindung an einem Rezeptor von einer intrinsischen Aktivität begleitet ist oder einen Einfluss auf die Wirkung von Liganden am Rezeptor hat, war Hyaluronsäure der Molekülmasse bis 3000Da weder als TLR2-Ligand noch als TLR4-Ligand klassifizierbar. Wie im Schrifttum erwähnt, stellt Hyaluronsäure ein Molekül bestehend aus der repetitiven Sequenz der Molekülfolge N-Acetyl-Glukosamin – D-Glukuronsäure dar. Die prinzipielle Bindungsfähigkeit an einem Rezeptor müsste somit für jede Länge des Hyaluronsäuremoleküls gegeben sein. So konnten Unterschiede im Bezug auf eine

mögliche Rezeptorbindung nur durch die Tertiärstruktur des Moleküls bedingt sein. Für eine Molekülmasse bis 3000Da war LPS-freie Hyaluronsäure erhältlich. In der Untersuchung ließ sich für die zum Test verwendete Hyaluronsäure kein LPS nachweisen. Die Grundlage für die weiteren Untersuchungen lieferte die Forschergruppe um Foidart et al., welche 1980 die Hyaluronsäurebildung durch Mesangialzellen nachwies. Scheibner et al. (2006) sprachen von einem ubiquitären Vorkommen der Hyaluronsäure. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass in einer Zellkultur mit Mesangialzellen Hyaluronsäure vorhanden war.

Hyaluronsäure wird hauptsächlich über CD44 an der Zelloberfläche gebunden (Lesley et al., 1997). Der Hyaluronsäuremantel der Zelle sowie dessen Abbau durch Hyaluronidase wurden von Rilla et al. (2008) visualisiert. In der Zellkultur sollten durch diesen Abbau Hyaluronsäuremoleküle unterschiedlicher Größe generiert werden, da die verfügbare Hyaluronsäure größerer Molekülmasse, also über 3000Da nicht endotoxinfrei zur Verfügung stand. Prima vista versprach die Hyaluronidase, extrahiert aus Stierhoden eine geringere Gefahr der LPS-Kontamination als die mikrobiell hergestellte, da LPS als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien (Endotoxin) vorkommt. Mittels Enzyminaktivierung und Polymyxin B, welches entsprechend Warren (1982) LPS bindet, wurde im Rahmen der Untersuchung jedoch nachgewiesen, dass auch die aus Stierhoden extrahierte Hyaluronidase LPS-kontaminiert war, was eine Modifikation der Untersuchung erzwang. [Anmerkung: Die Untersuchungen im Rahmen des Nachweises der LPS-Kontamination ergaben dass Hyaluronidase bei 95°C für 60 Minuten und nicht wie bei Houk et al. (1957) bei 70°C für 30 Minuten inaktiviert wurde.] Es wurde angenommen, dass im Rahmen der Untersuchung durch Hyaluronidase Hyaluronsäure unterschiedlicher Molekülmasse generiert wurde, welche auf Rezeptoren der Mesangialzellen in der Zellkultur einwirken konnte. Im ELISA konnte keine IL-6-Expression nachgewiesen werden, die auf der Enzymwirkung der Hyaluronidase beruhte, so dass keine Wirkung auf Rezeptoren gefunden werden konnte, deren nach geschaltete Signalkaskade zur Expression von IL-6 führt. Somit konnte weder die Aussage von Termeer et al. (2002), Hyaluronsäure sei ein TLR4-Ligand, noch die Aussage von Scheibner et al. (2006), Hyaluronsäure sei ein TLR2-Ligand, noch die Aussage von Jiang et al. (2011), Hyaluronsäure sei ein Ligand sowohl des TLR2 als auch des TLR4 bestätigt werden. Bezüglich der spezifischen TLR4-Ligandenfunktion ist auf Grund der vorliegenden Untersuchung der Schluss von Scheibner et al. (2006)

nachzuvollziehen, dass dieser Effekt durch eine LPS-Kontamination erklärbar ist. Die beobachtete Wirkungsverstärkung der spezifischen Liganden am TLR2 und TLR4 durch Hyaluronidase ließ im Zusammenhang vollständig andere Interpretation als die der Ligandenfunktion der Hyaluronsäure zu.

Wie erwähnt, hatte sich im Rahmen der Untersuchung der vorliegenden Arbeit ein Effekt der Wirkungsverstärkung der spezifischen TLR-Liganden auf TLR2 und TLR4 durch Hyaluronidase gezeigt. Dieser Effekt war unspezifisch und wegen der LPS-Kontamination der Hyaluronidase für den TLR4-Rezeptor nur eingeschränkt verwertbar. Weitere TLR-Liganden, welche auf Grund der LPS-Problematik auf Mesangialzellen ohne TLR4-Rezeptoren untersucht wurden, zeigten gleichfalls eine Wirkungsverstärkung der spezifischen Liganden am jeweiligen Rezeptor (TLR3 und TLR5). Das unterstrich die unspezifische Wirkung der Hyaluronidase für die Rezeptorwirkung. Darüber hinaus unterschieden sich die zusätzlich untersuchten Rezeptoren dadurch, dass ein Rezeptor an der Zelloberfläche lokalisiert ist (TLR5), während sich der andere intrazellulär befindet (TLR3). In Zusammenschau mit der Untersuchung von Rilla et al. (2008), in welcher gezeigt wurde, wie der Hyaluronsäuremantel durch Hyaluronidase abgebaut wurde, wurde in Analogie ein Barrieremechanismus für die Hyaluronsäure gefolgert. Durch den Abbau der Hyaluronsäurebarriere wird der Rezeptor besser zugänglich. Durch die verbesserte Zugänglichkeit der Rezeptoren steigt die Stimulierbarkeit der Rezeptoren. Das heißt, bei gleicher Anzahl der Rezeptoren und gleicher Anzahl der Liganden werden durch die bessere Zugänglichkeit der Rezeptoren mehr Bindungen am Rezeptor möglich. Es handelt sich also um ein quantitatives Problem der Liganden-Rezeptor-Interaktion. Durch die erhöhte Anzahl der angesprochenen Rezeptoren wird über die nachgeschaltete Signalkaskade mehr IL-6 generiert.

Zusammenfassend sprechen die Untersuchungsergebnisse dafür, dass Hyaluronsäure im Sinne einer Barriere fungiert und durch den Aufbau und Abbau der Hyaluronsäure die Ansprechbarkeit zumindest der untersuchten TLR-Rezeptoren moduliert wird. Die Funktion im Sinne einer passiven Barriere widerspricht der bisherigen Annahme, dass Hyaluronsäure ein aktiver TLR-Ligand ist (u.a. Termeer et al., 2002, Scheibner et al., 2006 und Jiang et al., 2010). Muto et al. (2009) fanden, dass Zellen ohne CD44 verglichen mit Zellen mit CD44, dem Hauptrezeptor für Hyaluronsäure an der Zelloberfläche (Lesley et al., 1997), eine stärkere Immunantwort nach Stimulation des TLR4-Rezeptors mit Endotoxin aufweisen. Das

unterstützt die Betrachtungsweise der Hyaluronsäure als Barriere. Durch eine verminderte Bindung von Hyaluronsäure an der Zelloberfläche ist die Barriere weniger stark ausgeprägt. Dadurch wird der TLR4 besser ansprechbar, wodurch die verstärkte Immunantwort verständlich wird. Die permanente Präsenz von langkettigen Hyaluronsäuremolekülen an der Zelloberfläche, wie sie über die Bindung durch u.a. CD44 gegeben ist, erhöht die Wahrscheinlichkeit des Kontaktes mit TLR an der Oberfläche der Zellen. Da Hyaluronsäure, bestehend aus repetitiven Disaccharideinheiten (Jiang et al., 2011) linearkettig (unverzweigt) aufgebaut ist, (Atkins et al., 1972) ist im Falle einer Bindung an einem Rezeptor jeder Abschnitt des Moleküls zur Bindung geeignet, da sich die Sequenz der Anordnung dieser Moleküle in alternierender Reihenfolge der beiden Bausteine über das gesamte Molekül erstreckt. Da somit bei Kontakt zwischen Hyaluronsäure und TLR eine Bindung zu erwarten wäre, würde bei jedem Kontakt die nachgeschalteten Signalkaskade aktiviert werden. Das wäre aus der Sicht der Ökonomie der Zelle nicht sinnvoll.

Mast et al. (1992) setzten Wunden an fetalen Kaninchen und verglichen die Wundheilung des hyaluronsäurereichen Gewebes mit der Wundheilung bei künstlich reduziertem Hyaluronsäuregehalt. Während bei unbeeinflusstem Hyaluronsäuregehalt eine narbenfreie Wundheilung erfolgte, zeigte sich nach Reduktion der Hyaluronsäure mittels Hyaluronidase eine reaktionsreiche Narbenbildung mit Einsprossung von Fibroblasten, Kollagenablagerung und Kapillarbildung, einem Zeichen für eine entzündliche Reaktion. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der Ergebnisse von Rilla et al. (2008) sind durch den reichen Hyaluronsäuregehalt, im Sinne einer Ummantelung der Zellen, die TLR-Rezeptoren zumindest vermindert ansprechbar, womit die Zytokinreaktion zumindest in vermindertem Umfang provoziert werden kann. Dadurch wird die entzündliche Reaktion unterdrückt, die zur Bildung von Kapillaren und der Einsprossung von Fibroblasten führt (Hunt et al., 1984; Hardy, 1989; Beer et al., 1998). Im Gegenzug führt der Abbau des Hyaluronsäuremantels durch Hyaluronidase zu der von Mast et al. (1992) beschriebenen reaktionsreichen Narbenbildung.

Insektengifte enthalten häufig Hyaluronidase (King und Wittkowski, 2011). Nach Inokulation des Giftes führt der Abbau der Hyaluronsäure zur Reduktion der hohen Wasserbindungskapazität, wodurch das Ödem erklärbar ist. Gleichzeitig erhöht sich durch den zumindest partiellen Wegfall der Hyaluronsäurebarriere die

Ansprechbarkeit der Rezeptoren für Entzündungsmediatoren, wodurch die Entzündungsreaktion verständlich wird. Der Abbau der Hyaluronsäure auf enzymatischem Wege mit konsekutiver Rezeptorfreilegung kann schneller erfolgen als eine Neusynthese von Rezeptoren mit Transport zur Zellmembran und dortiger Integration, womit die Freilegung als Form der Rezeptorregulation schneller ist. Rezeptorregulation durch Modulation der Ansprechbarkeit der Rezeptoren erklärt somit die schnelle Reaktion nach einem Insektenstich. Hyaluronsäure ist unter diesem Aspekt ein Regulator, ohne eine intrinsische Aktivität zu besitzen. Die Regulation des Hyaluronsäuremetabolismus ist vor diesem Hintergrund ein wichtiger Faktor in der Immunregulation. Möglicherweise besteht darüber hinaus eine Bedeutung bei weiteren rezeptorabhängigen Regulationen.

Eine reduzierte Barrierefunktion erhöht die Ansprechbarkeit der Rezeptoren. Die verstärkte Ansprechbarkeit der Rezeptoren ist somit als ein Mechanismus bei der Genese allergischer und rheumatologischer, möglicherweise auch onkologischer Erkrankungen zu diskutieren. Darauf deuten Untersuchungen von Sasaki et al. (2011) hin, im Rahmen derer eine verminderte Molekülgröße der Hyaluronsäure im Serum von Rheumapatienten festgestellt wurde. Die endogene Regulation des Hyaluronsäurestoffwechsels scheint hier wichtiger zu sein als die externe Zufuhr, da die Verteilung bis ins Interstitium problematisch sein könnte. So zeigten Svanovsky et al. (2008), dass Hyaluronsäure größerer Molekülmasse (450kDa) vermehrt in der Leber phagozytiert wird, während dies für Hyaluronsäure bis 100kDa nicht zutrifft. Die endogene Regulation der Hyaluronsäure erfolgt, entsprechend den in vitro Ergebnissen von Smith et al. (1982), durch Schilddrüsenhormone, wobei Trijodthyronin (T3) konzentrationsabhängig die Hyaluronsäuresynthese unterdrückt. Röck et al. (2011) fanden heraus, dass Kollagenfragmente die Hyaluronsäure-Synthese unterdrücken. Auch PDGF-BB (platelet derived growth factor, bestehend aus zwei B Untereinheiten) und transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) stimulieren unter Einbeziehung der Thyrosinkinase die Hyaluronsäure-Biosynthese (Suzuki et al., 1995).

Die Resultate der Untersuchungen mit hohen Konzentrationen hochmolekularen und niedermolekularen Heparins in der vorliegenden Arbeit zeigen eine Reduktion der IL-6-Antwort und somit eine Immunmodulation, möglicherweise durch Modulation der Stimulierbarkeit der Rezeptoren durch Heparin in hohen Konzentrationen. Dabei wurde der Effekt der Hyaluronidase nicht nur kompensiert, sondern ging weit darüber

hinaus. In hohen Konzentrationen wurde die IL-6-Expression bei Stimulation der untersuchten Zellen nach entsprechender Stimulation weitgehend unterdrückt. Die Feststellung von McClean (1942), Hyaluronsäure sei ein Inhibitor der Hyaluronidase muss daher zumindest modifiziert werden. Sowohl für HMW-Heparin (Heparin mit hoher Molekülmasse: 3000Da bis 30000Da, Maximum 12000Da bis 15000Da; Harenberg et al., 1988) als auch für LMW-Heparin (Heparin niedriger Molekülmasse: 1200Da bis 15000Da, Maximum zwischen 4000Da und 6000Da; Harenberg et al., 1988), repräsentiert durch Enoxaparin nahm der supprimierende Effekt auf die IL-6-Expression mit zunehmender Verdünnung des Heparins ab. Parra et al. (2011) fanden im Kaninchenknorpel ein heparinähnliches Heparansulfat. Heparine spielen somit im Knorpel eine Rolle. In der Zusammenschau mit der in dieser Arbeit beschriebenen Unterdrückung der IL-6-Antwort durch Heparine wäre eine topische Heparin-Applikation u.a. bei entzündlichen Gelenkerkrankungen zu diskutieren.

Neben dem spezifischen enzymatischen Abbau der Hyaluronsäure durch Hyaluronidase ist die Spaltung des Moleküls durch Radikale beschrieben (McNeil et al., 1989). Als Radikalbildungssystem dienten bei McNeil et al. (1989) äquimolare Konzentrationen von  $\text{FeSO}_4$  und EDTA in einem Bereich von  $[50\mu\text{mol/l}]$  bis  $[1000\mu\text{mol/l}]$ . Die Konzentration ist von Bedeutung im Bezug auf eine mögliche Zytotoxizität durch Fe(II)-Ionen. In der vorliegenden Arbeit kam eine errechnete Konzentration von  $[456\mu\text{mol/l}]$  zur Anwendung. He et al. (2008) untersuchten Caco-2-Zellen (Zelllinie eines Kolonkarzinoms) bezüglich der Toxizität von Fe(II)-Ionen und fanden erst ab einer Konzentration von  $[1,5\text{mmol/l}]$  einer erhöhte Zelltoxizität, während bei einer Konzentration von  $[0,5\text{mmol/l}]$  keine negativen Auswirkungen auf das Überleben der Zellen (95% lebende Zellen) festgestellt wurden. Somit ist die Menge der durch  $\text{FeSO}_4$  induzierten Radikale (Fenton-Reaktion; Valko et al., 2007) nicht als zytotoxisch zu betrachten. Anzumerken ist, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit K-EDTA zum Einsatz kam. Aus diesem Grunde erfolgte die Lösung von K-EDTA in NaCl-Lösung (0,9%), um die ungünstige Wirkung von Kalium bei extrazellulärer Applikation zu vermindern. Als Antioxidans wurde Ascorbinsäure verwendet, wobei reiner Ascorbinsäure der Vorzug vor Ascorbinsäure-Palmitat gegeben wurde, da PAM3CysSK4 drei Palmitoyl-Reste enthält und eine Bindung an den TLR2-Rezeptor über einen Palmitoyl-Rest sicher vermieden werden sollte. EDTA,  $\text{FeSO}_4$  und Ascorbinsäure hatten eine modulierende Funktion auf die Stimulation von TLR2 bzw. TLR4 durch ihre spezifischen Liganden, ohne alleine oder

in Kombination eine intrinsische Aktivität zu besitzen. Der Einfluss von  $\text{FeSO}_4$  auf die Hyaluronsäure hatte zwei Aspekte. Laut Valko et al. (2007) werden durch  $\text{Fe(II)}$ -Ionen Radikale induziert, welche laut McNeil et al. (1989) die Hyaluronsäure abbauen. Andererseits sind  $\text{Fe(II)}$ -Ionen als Hemmer der Hyaluronidase bekannt (Guilbault et al., 1967). Die Bestimmung der Hyaluronidaseaktivität erfolgte in der Untersuchung von Guilbault et al. (1967) in vitro durch Zugabe von  $\text{Fe(II)}$ -Ionen zum Substrat, wodurch eine hemmende Wirkung auf die Hyaluronidase nicht von der stabilisierenden Wirkung auf das Substrat unterschieden werden konnte. Die vorliegende Arbeit lieferte einen Hinweis darauf, dass Hyaluronsäure durch  $\text{FeSO}_4$  stabilisiert wird, wobei nicht differenziert werden konnte, ob der Effekt durch das  $\text{Fe(II)}$ -Ion oder das Sulfat bedingt war. Letztlich ließ sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit schlussfolgern, dass die Stabilisation der Hyaluronsäure mit einem verminderten Ansprechen des TLR2 und des TLR4 für ihren spezifischen Liganden einhergeht. Bei Hyaluronsäurespaltung wäre, entsprechend den Ergebnissen bei Inkubation mit Hyaluronidase, eine Erhöhung der IL-6-Expression zu erwarten gewesen.

Die Antwort auf die Stimulation von TLR2 und TLR4 durch ihre spezifischen Liganden wurde durch EDTA und Ascorbinsäure verstärkt, teilweise tendenziell, teilweise signifikant, wobei die Kombination von Ascorbinsäure und EDTA für eine signifikante Verstärkung der Antwort bei Stimulation des TLR durch seinen spezifischen Liganden sorgte. Ein Abbau der Hyaluronsäure durch Ascorbinsäure, nachgewiesen durch Viskosimetrie, wurde durch Soltés et al. (2007, a) beschrieben. Schmut und Hofmann (1975) zeigten eine Reduktion der Viskosität, also einen Abbau der Hyaluronsäure, durch EDTA. Unter dem Einfluss von Ascorbinsäure und EDTA, durch welche Hyaluronsäure abgebaut wird, wurde die somit die Stimulation der Toll-like-Rezeptoren durch ihren spezifischen Liganden verstärkt, während unter dem Einfluss von  $\text{FeSO}_4$ , welches entsprechend des Ergebnisses der vorliegenden Arbeit Hyaluronsäure stabilisiert, die Stimulation der TLR durch ihren spezifischen Liganden abgeschwächt wurde. Dies unterstützt die Folgerung aus den Hyaluronidase-Versuchen, dass Hyaluronsäure eine regulatorische Funktion hat, welche passiv über einen Barriere-Mechanismus ausgeübt wird.

Zusammenfassend bieten die Ergebnisse der Untersuchung im Rahmen der vorliegenden Arbeit viele Aspekte, die für den Barriereeffekt der Hyaluronsäure

sprechen. Die Resultate legen nahe dass ein vergleichbarer Funktionsmechanismus für ein weiteres Glykosaminoglykan, das Heparin, zutrifft. Einschränkend auf derart generalisierte Schlussfolgerungen wirkt die Tatsache, dass nur wenige Rezeptoren an primären Mesangialzellen untersucht wurden. Zumindest für diese Rezeptoren ist nicht anzunehmen, dass sich der Effekt für andere Zellen des Organismus von den hier beschriebenen grundlegend unterscheidet. Entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können die Aussagen von Termeer et al. (2002), Scheibner et al. (2006) und Jiang et al. (2010), Hyaluronsäure sei ein spezifischer Ligand des TLR2 und/oder TLR4, nicht bestätigt werden.

## 6 Zusammenfassung

Seit der Erstisolierung der Hyaluronsäure durch Meyer und Palmer 1934 wurden die physikalisch-chemischen, biologischen und physiologischen sowie die pathophysiologischen Eigenschaften der Hyaluronsäure intensiv untersucht. Eine der offenen Fragen, ob Hyaluronsäure einen Toll-like-Rezeptor4 (TLR4)-Liganden (Termeer et al., 2002), einen alleinigen TLR2-Liganden (Scheibner et al., 2006) oder einen Liganden beider TLR darstellt (Jiang et al., 2011) war der Ausgangspunkt der vorliegende Untersuchung.

Die Stimulation unterschiedlicher Toll-like-Rezeptoren, u.a. TLR2, TLR3, TLR4 und TLR5 führt zu einer Interleukin-6 (IL-6)-Expression (Patole et al., 2006). Daher wurde der Überstand auf Zellkulturplatten beimpfter muriner Mesangialzellen (von C57/BL6-Mäusen) vom TLR2- und TLR4- Knockout-Typ (pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen und pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen) mittels IL-6-ELISA untersucht. Neben dem jeweiligen Knockout-Status der Zellen konnte die intakte Signalkaskade, welche für die Anwendung des IL-6-ELISA als Detektor notwendig war, nachgewiesen werden. Für Hyaluronsäure bis zu einer Molekülmasse von 3000Da bei einer Konzentration von [50µg/ml] war keine intrinsische Wirkung am TLR2 und TLR4 nachzuweisen, was auch die Kontamination der Hyaluronsäure mit Endotoxin ausschloss. Während eine Verstärkung der Wirkung von PAM3CysSK4 am TLR2-Rezeptor durch Hyaluronsäure der Molekülmasse 1500Da bis 3000Da nicht auszuschließen war, war darüber hinaus keine Modulation auf die Wirkung der spezifischen Liganden am TLR2 (PAM3CysSK4) und TLR4 (LPS) feststellbar. Hyaluronidase aus Stierhoden in der Konzentration [1mg/ml] (750-1500U/ml) wurde zum Abbau des Hyaluronsäuremantels der Zellen (Rilla et al., 2008) eingesetzt und verstärkte die Wirkung von PAM3CysSK4 am TLR2 bzw. von LPS am TLR4. Durch eine mindestens 12-stündige Inkubation der Zellen mit Hyaluronidase konnten unterschiedlich große Hyaluronsäuremoleküle generiert werden. Ohne TLR-Ligand war nur der TLR4 durch Hyaluronidase stimulierbar, was mittels Hitzeinaktivierung der Hyaluronidase bei 95° für 60 Minuten und Polymyxin B als LPS-Effekt nachgewiesen werden konnte. Durch die fehlende Stimulierbarkeit wurde ein intrinsischer Effekt von Hyaluronsäure am TLR2 und TLR4, ausgeschlossen. Hyaluronidase verstärkte auch die spezifische Stimulation am TLR5, (Oberflächenrezeptor) durch Flagellin bzw. am TLR3 (intrazellulärer Rezeptor) durch Poly(I:C), untersucht an pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen. Die unspezifische Wirkungsverstärkung

des jeweiligen Liganden am TLR2, TLR3, TLR4 und TLR5 wurde als Barriereeffekt interpretiert, wobei der Abbau der Hyaluronsäurebarriere, bei gleicher Anzahl an Rezeptoren und Liganden, häufiger zu einer Liganden-Rezeptor-Interaktion führte. Die Überwindung der Barriere ist sowohl für das Andocken am Oberflächenrezeptor als auch am intrazellulären Rezeptor notwendig. Eine Rezeptorregulation über das Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation der Hyaluronsäure ist nicht nur schneller als durch Neusynthese von Rezeptoren in vielen Schritten mit konsekutiver Integration in die Zellmembran, sondern erklärt auch die klinische Symptomatik hyaluronidasehaltiger Gifte. Die verminderte Wasserbindungskapazität der abgebauten Hyaluronidase führt zum Ödem, während die bessere Zugänglichkeit der Rezeptoren die Entzündungsreaktion bedingt. Unter dem Barriereaspekt spielt die Rezeptorregulation durch den Hyaluronsäurestoffwechsel möglicherweise eine zentrale Rolle im Rahmen der Genese von Allergien sowie rheumatologischer und eventuell onkologischer Erkrankungen.

Heparin, seit McClean (1942) als Hyaluronidaseantagonist bekannt, hob den Unterschied in der IL-6-Expression bei spezifischer Stimulation von TLR2 bzw. TLR4 mit und ohne Hyaluronidase nicht wie erwartet auf, sondern unterdrückte die IL-6-Expression darüber hinaus weitestgehend. Die für Heparin mit hoher (Heparin) und niedriger (Enoxaparin) Molekülmasse gleichartige Unterdrückung der IL-6-Expression galt sowohl für pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen als auch für pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen und nahm bei zunehmender Verdünnung des Heparins ab. Die unspezifische Wirkung sprach für einen Barriereeffekt des Heparins, wie Hyaluronsäure ein Glykosaminoglykan, welcher möglicherweise die Rezeptorliganden daran hindert, ihren jeweiligen Rezeptor zu erreichen und an ihm zu binden. Eine therapeutisch nutzbare protektive Funktion des Heparin, beispielsweise durch topische Anwendung bei entzündlichen Gelenkerkrankungen ist somit denkbar, speziell da ein heparinähnliches Heparansulfat ein Bestandteil des Gelenkknorpels ist, wie Parra et al. (2011) beim Kaninchen zeigten.

Versuche zum Abbau der Hyaluronsäure durch Radikale, generiert aus äquimolaren Mengen von FeSO<sub>4</sub> und EDTA (McNeil et al, 1989), wurden mit und ohne Antioxidans (Ascorbinsäure) durchgeführt, wobei die Eisenkonzentration nicht in einem zytotoxischen Bereich war (He et al., 2008). Die Mesangialzellen reduzierten ihre IL-6-Expression nach Stimulation von TLR2 (pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen) bzw. des TLR4 (pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen) mit dem jeweils spezifischen Liganden, wenn FeSO<sub>4</sub>

alleine oder in Kombination mit EDTA zugefügt wurde. Hyaluronsäure hoher Molekülmasse wurde durch  $\text{FeSO}_4$  in vitro (ex vivo) nicht, wie postuliert, über induzierte Radikale gespalten, sondern stabilisiert. Die Kombination aus EDTA und Ascorbinsäure verstärkte die IL-6-Expression bei jeweils spezifischer TLR-Stimulation signifikant, während eine Verstärkung durch Ascorbinsäure bzw. EDTA alleine teilweise tendenziell und teilweise signifikant war. Da Hyaluronsäure durch Ascorbinsäure (Soltés et al., 2007, a) und EDTA (Schmut und Hofmann, 1975) abgebaut wird und wie beschrieben durch  $\text{FeSO}_4$  stabilisiert wird, waren die Wirkungen der drei Substanzen mit der Barrierefunktion der Hyaluronsäure vereinbar.

Da die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ausschließlich an pMC/TLR2-/- Zellen und pMC/TLR4-/- Zellen von C57/BL6-Mäusen durchgeführt wurden, ist der Aussagewert der Arbeit eingeschränkt. Ein grundlegender Unterschied zwischen Mesangialzellen und anderen Zellen des Organismus im Zusammenspiel zwischen Hyaluronsäure bzw. Heparin und Toll-like-Rezeptoren ist jedoch nicht anzunehmen.

## 7 Summary

Since the first isolation of hyaluronan (former: hyaluronic acid) by Meyer and Palmer (1934) its physico-chemical, biological, physiological and patho-physiological properties have been examined extensively. The unclear situation, whether hyaluronan is a Toll-like-receptor4 (TLR4)-ligand (Termeer et al., 2002), a mere TLR2-ligand (Scheibner et al., 2006) or a ligand of TLR2 and TLR4 (Jiang et al., 2011) was the starting point for the present study.

The stimulation of different Toll-like-receptors f. ex. TLR2, TLR3, TLR4 und TLR5, leads to an interleukin-6 (IL-6)-expression (Patole et al., 2006). So the supernatant of murine mesangial cells, cultures on cell-culture-plates was examined by IL-6-ELISA. Murine mesangial cells from TLR2- and TLR4-knockout mice (pMC/TLR2<sup>-/-</sup> cells and pMC/TLR4<sup>-/-</sup> cells) were used.

The present study confirmed the knockout-status of the respective cell types and showed an intact signal cascade, justifying the application of IL-6-ELISA as a detector for the stimulation of the Toll-like-receptors. The examination of highly purified hyaluronan <3000Da could not prove any intrinsic activity, but confirmed the absence of detectable endotoxin, and neither showed, nor a blocking activity. While it could not be ruled out completely that the stimulatory effect of PAM3CysSK4 on TLR2 was increased by hyaluronan 1500Da to 3000Da, a further modulating effect of hyaluronan <3000Da on the stimulation of TLR2 and TLR4 by their ligands was not detectable.

Hyaluronidase derived from bovine testis was used to degrade the hyaluronan coat of the cells (Rilla et al., 2008) in the concentration of [1mg/ml] (750-1500U/ml). The incubation time was more than 12 hours to allow the formation of hyaluronan of different size. Incubation with merely hyaluronidase only stimulated the TLR4, which turned out to be an effect of LPS-contamination. This was shown by heat inactivation of hyaluronidase at 95°C for 60 minutes, and the use of polymyxin B. The lacking stimulatory effect of hyaluronidase ruled out an intrinsic effect of hyaluronan on TLR2 and TLR4. Hyaluronidase increased the stimulatory effect of the specific ligands on their TLR, i.e. TLR2 by PAM3CysSK4, on TLR3 by poly(I:C), on TLR4 by LPS, and on TLR5 by flagellin. TLR3 (an intracellular receptor) and TLR5 (a surface receptor) were examined on pMC/TLR4<sup>-/-</sup> cells. The hyaluronidase-effect was unspecific and could be explained via the degradation of a hyaluronan-barrier. By the degradation of the barrier the number of ligand-receptor-interactions was increased, while the

number of ligands and receptors remained unchanged. The ligands need to cross barrier to reach the surface-receptors as well as the intracellular receptors. The quantitative regulation of a receptor via the balance between synthesis and degradation of hyaluronan is not only faster than by novel synthesis of receptors with consecutive integration into the cell membrane, but explains the clinical symptoms caused by venoms containing hyaluronidase. The reduced water-binding capacity of hyaluronan leads to an edema, while the improved accessibility of the receptors explains the inflammatory reaction. Under the barrier-aspect, the hyaluronan-metabolism might play a central role in the genesis of allergies and rheumatoid and probably oncological diseases.

Heparin, since McClean (1942) known as a hyaluronidase-antagonist, did not only compensate the difference between the stimulation of TLR2 and TLR4 by their ligands with and without hyaluronidase, but led to an almost complete IL-6-suppression. This suppressing effect of heparin on the IL-6-expression was the same for high (heparin) and low (enoxaparin) molecular weight heparin and was reduced with increasing dilutions of heparin. This unspecific effect of heparin, a glycosaminoglycan, favoured a barrier-effect for heparin, a barrier, which prevented the ligands from reaching their receptors. A usable protective function of heparin, f. ex. by topical use in inflammatory joint disorders, is conceivable, especially since Parra et al. (2011) found a heparin-like heparansulfate in joint cartilage (in rabbits).

In the setting for the degradation of hyaluronan by radicals, equimolar amounts of  $\text{FeSO}_4$  and EDTA (McNeil et al, 1989) were used, while the concentration of iron was below the cytotoxic level (He et al., 2008). Ascorbic acid was used as an antioxidant. The mesangial cells reduced the IL-6-expression after stimulation of the TLR2 (pMC/TLR4<sup>-/-</sup> Zellen) and TLR4 (pMC/TLR2<sup>-/-</sup> Zellen), respectively, when  $\text{FeSO}_4$  was added, either alone or in combination with EDTA. When high molecular hyaluronan was incubated with  $\text{FeSO}_4$  in vitro (ex vivo), hyaluronan was not degraded as expected, but stabilised. The incubation with ascorbic acid and EDTA, respectively, increased the IL-6-expression due to the stimulation of the TLR2 and TLR4 by their specific ligands, partly as a tendency, partly significantly, while the effect by the combination of ascorbic acid and EDTA was significant. Since hyaluronan is degraded by ascorbic acid (Soltés et al., 2007, a), and EDTA (Schmut und Hofmann, 1975) and stabilized by  $\text{FeSO}_4$ , the effects of the three substances were compatible with the barrier-function of hyaluronan.

The present study was performed on mesangial cells of C57/BL6 mice with a knockout for TLR2 and TLR4, respectively. Therefore, a generalised conclusion can only be drawn with caution, while it is not likely that at least the described interaction between toll-like-receptors of mesangial cells and hyaluronan and heparin, respectively is fundamentally different in other cells of the organism.

## 8 Literaturverzeichnis

Allen AG, Lindsay H, Seilly D, Bolitho S, Peters SE, Maskell DJ.

Identification and characterisation of hyaluronate lyase from *Streptococcus suis*.  
Microb Pathog. 2004 Jun;36(6):327-335.

Anderegg U, Eichenberg T, Parthaune T, Haiduk C, Saalbach A, Milkova L, Ludwig A, Grosche J, Averbeck M, Gebhardt C, Voelcker V, Sleeman JP, Simon JC.

ADAM10 is the constitutive functional sheddase of CD44 in human melanoma cells.  
J Invest Dermatol. 2009 Jun;129(6):1471-1482.

Atkins ED, Sheehan JK.

Structure for hyaluronic acid.

Nat New Biol. 1972 Feb 23;235(60):253-254.

Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG.

LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan.

J Cell Biol. 1999 Feb 22;144(4):789-801.

Banerji S, Wright AJ, Noble M, Mahoney DJ, Campbell ID, Day AJ, Jackson DG.

Structures of the CD44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate-protein interaction.

Nat Struct Mol Biol. 2007 Mar;14(3):234-239.

Barnes JL, Gorin Y.

Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases.

Kidney Int. 2011 May;79(9):944-956.

Beer TW, Baldwin HC, Goddard JR, Gallagher PJ, Wright DH.

Angiogenesis in pathological and surgical scars.

Hum Pathol. 1998 Nov;29(11):1273-1278.

Berg S, Brodin B, Hesselvik F, Laurent TC, Maller R.  
Elevated levels of plasma hyaluronan in septicaemia.  
Scand J Clin Lab Invest. 1988 Dec;48(8):727-732.

Berg S.  
Hyaluronan turnover in relation to infection and sepsis.  
J Intern Med. 1997 Jul;242(1):73-77.

Bernstein J, Cheng F, Roszka J.  
Glomerular differentiation in metanephric culture.  
Lab Invest. 1981 Aug;45(2):183-190.

Boor P, van Roeyen CR, Kunter U, Villa L, Bücher E, Hohenstein B, Hugo CP,  
Eriksson U, Satchell SC, Mathieson PW, Eitner F, Floege J, Ostendorf T.  
PDGF-C mediates glomerular capillary repair.  
Am J Pathol. 2010 Jul;177(1):58-69.

Blumenthal HJ, Roseman S.  
Quantitative estimation of chitin in fungi.  
J Bacteriol. 1957 Aug;74(2):222-224.

Bretscher A.  
Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family.  
Curr Opin Cell Biol. 1999 Feb;11(1):109-116.

Brown HJ, Lock HR, Sacks SH, Robson MG.  
TLR2 stimulation of intrinsic renal cells in the induction of immune-mediated  
glomerulonephritis.  
J Immunol. 2006 Aug 1;177(3):1925-1931.  
Erratum in J Immunol. 2007 Jun 1;178(11):7485.

Bruno S, Bussolati B, Grange C, Collino F, di Cantogno LV, Herrera MB, Biancone L, Tetta C, Segoloni G, Camussi G.

Isolation and characterization of resident mesenchymal stem cells in human glomeruli.

Stem Cells Dev. 2009 Jul-Aug;18(6):867-880.

Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A Jr, Kubalak S, Klewer SE, McDonald JA.

Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme.

J Clin Invest. 2000 Aug;106(3):349-360.

Cardoso LS, Araujo MI, Góes AM, Pacífico LG, Oliveira RR, Oliveira SC.

Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis.

Microb Cell Fact. 2007 Jan 3;6:1.

Chain E, Duthie ES.

A mucolytic enzyme in testis extracts.

Nature 1939; 144(3658):977-978

Chang ZL.

Important aspects of toll-like receptors, ligands and their signaling pathways.

Inflamm Res. 2010 Oct;59(10):791-808.

Chi A, Shirodkar SP, Escudero DO, Ekwenna OO, Yates TJ, Ayyathurai R, Garcia-Roig M, Gahan JC, Manoharan M, Bird VG, Lokeshwar VB.

Molecular characterization of kidney cancer: association of hyaluronic acid family with histological subtypes and metastasis.

Cancer. 2011 Sep 1. doi: 10.1002/cncr.26520.

Christensen JF.

A spreading factor from serum.

J Pathol. Bacteriol 1939;48(2):287-290

Csóka AB, Scherer SW, Stern R.

Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31.

Genomics. 1999 Sep 15;60(3):356-361.

Csóka AB, Frost GI, Stern R.

The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes

Matrix Biol. 2001 Dec;20(8):499-508.

Debbasch C, De La Salle SB, Brignole F, Rat P, Warnet JM, Baudouin C.

Cytoprotective effects of hyaluronic acid and Carbomer 934P in ocular surface epithelial cells.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002 Nov;43(11):3409-3415.

Edgar181

<http://de.wikipedia.org/wiki/Hyaluronsäure>

Ferrara JJ, Reed RK, Dyess DL, Townsley MI, Onarheim H, Laurent TC, Taylor AE.

Increased hyaluronan flux from skin following burn injury.

J Surg Res. 1991 Mar;50(3):240-244.

Fisher CA, Bhattarai EK, Osterstock JB, Dowd SE, Seabury PM, Vikram M, Whitlock RH, Schukken YH, Schnabel RD, Taylor JF, Womack JE, Seabury CM.

Evolution of the bovine TLR gene family and member associations with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection.

PLoS One. 2011;6(11):e27744.

Fischer-Szafarz B, Litynska A, Zou L.

Human hyaluronidases: electrophoretic multiple forms in somatic tissues and body fluids. Evidence for conserved hyaluronidase potential N-glycosylation sites in different mammalian species.

J Biochem Biophys Methods. 2000 Sep 11;45(2):103-116.

Foidart JB, Pirard YS, Winand RJ, Mahieu PR.

Tissue culture of normal rat glomeruli: glycosaminoglycan biosynthesis by homogeneous epithelial and mesangial cell populations.

Ren Physiol. 1980;3(1-6):169-173.

Forrester JV, Balazs EA.

Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate.

Immunology. 1980 Jul;40(3):435-446.

Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB.

Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover.

J Intern Med. 1997 Jul;242(1):27-33.

Gannon JR.

Clinical experiences with intravenous use of sodium hyaluronate in racing greyhounds.

Aust Vet J. 1998 Jul;76(7):474-475.

Ghayur MN, Krepinsky JC, Janssen LJ.

Contractility of the renal glomerulus and mesangial cells: lingering doubts and strategies for the future.

Med Hypotheses Res. 2008 Jan;4(1):1-9.

Ghosh S, Karin M.

Missing pieces in the NF-kappaB puzzle.

Cell. 2002 Apr;109 Suppl:S81-96.

Goldman JM, Karp CL.

Adjunct devices for managing challenging cases in cataract surgery: capsular staining and ophthalmic viscosurgical devices.

Curr Opin Ophthalmol. 2007 Feb;18(1):52-57.

Göransson V, Johnsson C, Jacobson A, Heldin P, Hällgren R, Hansell P.  
Renal hyaluronan accumulation and hyaluronan synthase expression after  
ischaemia-reperfusion injury in the rat.  
Nephrol Dial Transplant. 2004 Apr;19(4):823-830.

Guilbault GG, Kramer DN, Hackley E.  
Fluorometric determination of hyaluronidase and of Cu(II), Fe(II), and cyanide ion  
inhibitors.  
Anal Biochem. 1967 Feb;18(2): 241-247.

Gupta S.  
Cytokines: molecular and biological characteristics.  
Scand J Rheumatol Suppl. 1988;76:189-201.

Habermann E.  
Trennung von Hyaluronidase (spreading factor) und Neuraminidase (receptor  
destroying enzyme) des Gasbrandgiftes.  
Hoppe-Seylers Z Physiol Chem. 1960 Dez 31;322:158-163.

Hänsel R., Sticher O.  
Kapitel 20.2.2 Hyaluronsäure  
in: Pharmakognosie-Phytopharmazie, Rudolf Hänsel & Otto Sticher (Hrsg.)  
9.Auflage, 2009, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2010, S.606-609

Hansell P, Göransson V, Odling C, Gerdin B, Hällgren R.  
Hyaluronan content in the kidney in different states of body hydration.  
Kidney Int. 2000 Nov;58(5):2061-2068.

Harenberg J, Heene DL.  
Pharmacology and special clinical applications of low-molecular-weight heparins.  
Am J Hematol. 1988 Dec;29(4):233-240.

Hardy MA.

The biology of scar formation.

Phys Ther. 1989 Dec;69(12):1014-1024.

Harris EN, Kyosseva SV, Weigel JA, Weigel PH.

Expression, processing, and glycosaminoglycan binding activity of the recombinant human 315-kDa hyaluronic acid receptor for endocytosis (HARE).

J Biol Chem. 2007 Feb 2;282(5):2785-2797.

Harris EN, Weigel JA, Weigel PH.

The human hyaluronan receptor for endocytosis (HARE/Stabilin-2) is a systemic clearance receptor for heparin.

J Biol Chem. 2008 Jun 20;283(25):17341-17350.

Hascall V und Esko JD.

Chapter 15 Hyaluronan

in: Essentials of Glycobiology. 2nd edition.

Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors.

Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

He W, Feng Y, Li X, Wei Y, Yang X.

Availability and toxicity of Fe(II) and Fe(III) in Caco-2 cells

J Zhejiang Univ Sci B. 2008 September; 9(9): 707–712.

Houck JC, Pearce RH.

A new bovine testicular mucopolysaccharase.

J Biol Chem. 1957 May;226(1):267-276.

Hugo C, Shankland SJ, Bowen-Pope DF, Couser WG, Johnson RJ.

Extraglomerular origin of the mesangial cell after injury. A new role of the juxtaglomerular apparatus.

J Clin Invest. 1997 Aug 15;100(4):786-794.

Hunt TK, Knighton DR, Thakral KK, Goodson WH 3rd, Andrews WS.  
Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages.  
Surgery. 1984 Jul;96(1):48-54.

Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K.  
Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties.  
J Biol Chem. 1999 Aug 27;274(35):25085-25092.

Jiang D, Liang J, Noble PW.  
Hyaluronan as an immune regulator in human diseases.  
Physiol Rev. 2011 Jan;91(1):221-264.

Kamikura DM, Khoury H, Maroun C, Naujokas MA, Park M.  
Enhanced transformation by a plasma membrane-associated met oncoprotein: activation of a phosphoinositide 3'-kinase-dependent autocrine loop involving hyaluronic acid and CD44.  
Mol Cell Biol. 2000 May;20(10):3482-3496.

Kaplan D, Meyer K.  
The fate of injected mucopolysaccharides.  
J Clin Invest. 1962; 41(4):743-749.

Kawcak CE, Frisbie DD, Trotter GW, McIlwraith CW, Gillette SM, Powers BE, Walton RM.  
Effects of intravenous administration of sodium hyaluronate on carpal joints in exercising horses after arthroscopic surgery and osteochondral fragmentation.  
Am J Vet Res. 1997 Oct;58(10):1132-1140.

Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T.  
Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm  
through cumulus mass.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec 13;102(50):18028-18033.

King TP, Wittkowski KM.  
Hyaluronidase and hyaluronan in insect venom allergy.  
Int Arch Allergy Immunol. 2011;156(2):205-211.

Kreiner T, Moore HP.  
Membrane traffic between secretory compartments is differentially affected during  
mitosis.  
Cell Regul. 1990 Apr;1(5):415-424.

Kucera K, Koblansky AA, Saunders LP, Frederick KB, De La Cruz EM, Ghosh S,  
Modis Y.  
Structure-based analysis of *Toxoplasma gondii* profilin: a parasite-specific motif is  
required for recognition by Toll-like receptor 11.  
J Mol Biol. 2010 Nov 5;403(4):616-629.

Kumar A, Zhang J, Yu FS.  
Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C)-induced antiviral response in human corneal  
epithelial cells.  
Immunology. 2006 Jan;117(1):11-21.

Kwon S, Gewirtz AT, Hurley DJ, Robertson TP, Moore JN, Vandenplas ML.  
Disparities in TLR5 expression and responsiveness to flagellin in equine neutrophils  
and mononuclear phagocytes.  
J Immunol. 2011 Jun 1;186(11):6263-6270.

Lachman LB, Page SO, Metzgar RS.  
Partial purification of human lymphocyte activating factor.  
Prep Biochem. 1980;10(4):387-403. (a)

Lachman LB, Page SO, Metzgar RS.  
Purification of human interleukin 1.  
J Supramol Struct. 1980;13(4):457-466. (b)

Laurent TC.  
Biochemistry of hyaluronan.  
Acta Otolaryngol Suppl. 1987;442:7-24.

Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR.  
The structure and function of hyaluronan: An overview.  
Immunol Cell Biol. 1996 Apr;74(2):A1-7.

Lee TH, Wisniewski HG, Vilcek J.  
A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44.  
J Cell Biol. 1992 Jan;116(2):545-557.

Lesley J, Hyman R, English N, Catterall JB, Turner GA.  
CD44 in inflammation and metastasis.  
Glycoconj J. 1997 Aug;14(5):611-622.

Lim BJ, Lee D, Hong SW, Jeong HJ.  
Toll-like receptor 4 signaling is involved in IgA-stimulated mesangial cell activation.  
Yonsei Med J. 2011 Jul;52(4):610-615.

Lynn BD, Turley EA, Nagy JI.  
Subcellular distribution, calmodulin interaction, and mitochondrial association of the hyaluronan-binding protein RHAMM in rat brain.  
J Neurosci Res. 2001 Jul 1;65(1):6-16.

Maingonnat C, Courel MN, Bertrand P, Vincent JC, Sesboüé R, Delpech B.  
Hyaluronidase in sera of tumour-bearing nude mice.  
Biomarkers. 2003 May-Aug;8(3-4):333-338.

Mast BA, Haynes JH, Krummel TM, Diegelmann RF, Cohen IK.  
In vivo degradation of fetal wound hyaluronic acid results in increased fibroplasia,  
collagen deposition, and neovascularization.  
Plast Reconstr Surg. 1992 Mar;89(3):503-509

McClellan, D  
The in vivo decapsulation of streptococci by hyaluronidase.  
J . Path. Bat. 1942; 54: 284.

McDonald KJ, Cameron AJ, Allen JM, Jardine AG.  
Expression of Fc alpha/mu receptor by human mesangial cells: a candidate receptor  
for immune complex deposition in IgA nephropathy.  
Biochem Biophys Res Commun. 2002 Jan 11;290(1):438-442.

McNeil JD, Wiebkin OW, Cleland LG, Skosey JL.  
The effects of hyaluronic acid on macrophage Fc receptor binding and phagocytosis  
are independent of the mode of depolymerization.  
Free Radic Res Commun. 1989;6(4):227-233.

Merzendorfer H, Zimoch L.  
Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases  
and chitinases.  
J Exp Biol. 2003 Dec;206(Pt 24):4393-4412.

Meyer K., Palmer J.  
The polysaccharide of the vitreous humor  
J Biol Chem (1934) (107):629-634

Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M.  
IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions.  
Source  
Clin Sci (Lond). 2012 Feb 1;122(4):143-159.

Muto J, Yamasaki K, Taylor KR, Gallo RL.  
Engagement of CD44 by hyaluronan suppresses TLR4 signaling and the septic response to LPS.  
Mol Immunol. 2009 Dec;47(2-3):449-456.

Oliferenko S, Kaverina I, Small JV, Huber LA.  
Hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia outgrowth.  
J Cell Biol. 2000 Mar 20;148(6):1159-1164.

Onarheim H, Reed RK, Laurent TC.  
Elevated hyaluronan blood concentrations in severely burned patients.  
Scand J Clin Lab Invest. 1991 Dec;51(8):693-697.

Park MS, Chang JY, Kang JH, Park KP, Kho HS.  
Rheological properties of hyaluronic acid and its effects on salivary enzymes and candida.  
Oral Dis. 2010 May;16(4):382-387.

Parra A, Veraldi N, Locatelli M, Fini M, Martini L, Torri G, Sangiorgi L, Bisio A.  
Heparin-like heparin sulfate from rabbit cartilage.  
Glycobiology. 2011 Sep 20. [Epub ahead of print]

Patole PS, Pawar RD, Lech M, Zecher D, Schmidt H, Segerer S, Ellwart A, Henger A, Kretzler M, Anders HJ.  
Expression and regulation of Toll-like receptors in lupus-like immune complex glomerulonephritis of MRL-Fas(lpr) mice.  
Nephrol Dial Transplant. 2006 Nov;21(11):3062-3073.

Philipson LH, Schwartz NB.  
Subcellular localization of hyaluronate synthetase in oligodendroglioma cells.  
J Biol Chem. 1984 Apr 25;259(8):5017-5023.

Pienimäki JP, Rilla K, Fulop C, Sironen RK, Karvinen S, Pasonen S, Lammi MJ, Tammi R, Hascall VC, Tammi MI.

Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan.

J Biol Chem. 2001 Jun 8;276(23):20428-20435.

Prehm P.

Hyaluronate is synthesized at plasma membranes.

Biochem J. 1984 Jun 1;220(2):597-600.

Ragan C, Meyer K.

The hyaluronic acid of synovial fluid in rheumatoid arthritis.

J Clin Invest. 1949 Jan;28(1):56-59.

Reichenbach S, Blank S, Rutjes AW, Shang A, King EA, Dieppe PA, Jüni P, Trelle S. Hylan versus hyaluronic acid for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis.

Arthritis Rheum. 2007 Dec 15;57(8):1410-1418.

Rilla K, Tiihonen R, Kultti A, Tammi M, Tammi R.

Pericellular hyaluronan coat visualized in live cells with a fluorescent probe is scaffolded by plasma membrane protrusions.

J Histochem Cytochem. 2008 Oct;56(10):901-910.

Röck K, Grandoch M, Majora M, Krutmann J, Fischer JW.

Collagen fragments inhibit hyaluronan synthesis in skin fibroblasts in response to ultraviolet B (UVB): new insights into mechanisms of matrix remodeling.

J Biol Chem. 2011 May 20;286(20):18268-18276.

Rügheimer L, Olerud J, Johnsson C, Takahashi T, Shimizu K, Hansell P.

Hyaluronan synthases and hyaluronidases in the kidney during changes in hydration status.

Matrix Biol. 2009 Sep;28(7):390-395.

Sasaki Y, Uzuki M, Nohmi K, Kitagawa H, Kamataki A, Komagamine M, Murakami K, Sawai T.

Quantitative measurement of serum hyaluronic acid molecular weight in rheumatoid arthritis patients and the role of hyaluronidase.

Int J Rheum Dis. 2011 Oct;14(4):313-319.

Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR.

Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2.

J Immunol. 2006 Jul 15;177(2):1272-1281.

Schlöndorff D.

The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte.

FASEB J. 1987 Oct;1(4):272-281.

Schlöndorff D, Banas B.

The mesangial cell revisited: no cell is an island.

J Am Soc Nephrol. 2009 Jun;20(6):1179-1187.

Schmut O, Hofmann H.

Studies on the generation of hydrogen peroxide during some non-enzymic reactions changing the hyaluronic acid molecule.

Biochim Biophys Acta. 1975 Dec 5;411(2):231-235.

Shi Z, Cai Z, Sanchez A, Zhang T, Wen S, Wang J, Yang J, Fu S, Zhang D.

A novel toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus.

J Biol Chem. 2011 Feb 11;286(6):4517-4524.

Smith TJ, Murata Y, Horwitz AL, Philipson L, Refetoff S.

Regulation of glycosaminoglycan synthesis by thyroid hormone in vitro.

J Clin Invest. 1982 Nov;70(5):1066-1073.

- Soltés L, Valachová K, Mendichi R, Kogan G, Arnhold J, Gemeiner P.  
Solution properties of high-molar-mass hyaluronans: the biopolymer degradation by ascorbate.  
Carbohydr Res. 2007 Jun 11;342(8):1071-1077. (a)
- Soltés L, Kogan G, Stankovska M, Mendichi R, Rychlý J, Schiller J, Gemeiner P.  
Degradation of high-molar-mass hyaluronan and characterization of fragments.  
Biomacromolecules. 2007 Sep;8(9):2697-2705. (b)
- Stern R, Asari AA, Sugahara KN.  
Hyaluronan fragments: an information-rich system.  
Eur J Cell Biol. 2006 Aug;85(8):699-715.
- Sugahara K, Schwartz NB, Dorfman A.  
Biosynthesis of hyaluronic acid by Streptococcus.  
J Biol Chem. 1979 Jul 25;254(14):6252-6261.
- Suzuki, M, Asplund, T, Yamashita, H, Heldin, C-H, and Heldin, P.  
Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor- $\beta$ 1 involves activation of protein kinase C.  
J Biochem. 1995; 307, 817-821
- Svanovsky E, Velebny V, Laznickova A, Laznicek M.  
The effect of molecular weight on the biodistribution of hyaluronic acid radiolabeled with  $^{111}\text{In}$  after intravenous administration to rats.  
Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2008 Jul-Sep;33(3):149-157.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S.  
Toll-like receptors.  
Annu Rev Immunol. 2003;21:335-376.
- Tammi R, Rönkkö S, Agren UM, Tammi M.  
Distribution of hyaluronan in bull reproductive organs.  
J Histochem Cytochem. 1994 Nov;42(11):1479-1486.

Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC.  
Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4.  
J Exp Med. 2002 Jan 7;195(1):99-111.

Tezel A, Fredrickson GH.  
The science of hyaluronic acid dermal fillers.  
J Cosmet Laser Ther. 2008 Mar;10(1):35-42.

Tosato G, Seamon KB, Goldman ND, Sehgal PB, May LT, Washington GC, Jones KD, Pike SE.  
Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon-beta 2 (BSF-2, IL-6).  
Science. 1988 Jan 29;239(4839):502-504.

Triggs-Raine B, Salo TJ, Zhang H, Wicklow BA, Natowicz MR.  
Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 May 25;96(11):6296-6300.

Turley EA.  
Hyaluronan and cell locomotion.  
Cancer Metastasis Rev. 1992 Mar;11(1):21-30.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.  
Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.  
Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84.

van Maren WW, Nierkens S, Toonen LW, Bolscher JM, Suttmuller RP, Adema GJ.  
Multifaceted effects of synthetic TLR2 ligand and Legionella pneumophila on Treg-mediated suppression of T cell activation.  
BMC Immunol. 2011 Mar 24;12:23.

Warren JR.

Polymyxin B suppresses the endotoxin inhibition of concanavalin a-mediated erythrocyte agglutination.

Infect Immun. 1982 Feb;35(2):594-599.

Wiegner AW.

Mechanism of thixotropic behavior at relaxed joints in the rat.

J Appl Physiol. 1987 Apr;62(4):1615-1621.

Wright RP, Chan TK, Honetschlager L, Howell DE, Odell GV.

Enzymes and toxins of the scorpion venom *Palamneus gravimanus*.

Toxicon. 1977;15(3):197-205.

Yung S, Tsang RC, Leung JK, Chan TM.

Increased mesangial cell hyaluronan expression in lupus nephritis is mediated by anti-DNA antibody-induced IL-1beta.

Kidney Int. 2006 Jan;69(2):272-280.

## 9 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Zellulose – Hyaluronsäure - Chitin
Tabelle 2:	Funktionen der Hyaluronsäure [modifiziert nach Stern et al., 2006]
Tabelle 3:	Toll-like-Rezeptoren und spezifische Liganden
Tabelle 4:	Referenzen für Anhaltspunkte zur Wahl der Konzentrationen
Tabelle 5:	Viskositätsvergleich durch Messung der Flussgeschwindigkeit in einer Pipette

### Tabellen im Anhang

Tabelle 6 a:	Stimulation der pMC/TLR2-/- Zellen mit Hyaluronsäure <3000Da
Tabelle 6 b:	Stimulation der pMC/TLR4-/- Zellen mit Hyaluronsäure <3000Da
Tabelle 7 a-1:	Co-Stimulation der pMC/TLR2-/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS bzw. PAM3CysSK4
Tabelle 7 a-2:	Co-Stimulation der pMC/TLR2-/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS
Tabelle 7 a-3:	Co-Stimulation der pMC/TLR2-/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS
Tabelle 7 b-1:	Co-Stimulation der pMC/TLR4-/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS
Tabelle 7 b-2:	Co-Stimulation der pMC/TLR4-/- Zellen mit Hyaluronsäure und PAM3CysSK4
Tabelle 8 a:	Hyaluronidase-Verdünnungsreihe bei gleichbleibender LPS-Konzentration (pMC/TLR2-/- Zellen)
Tabelle 8 b:	Hyaluronidase-Verdünnungsreihe bei gleich bleibender PAM3CysSK4-Konzentration (pMC/TLR4-/- Zellen)
Tabelle 9 a-1:	LPS-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR2-/- Zellen) (I)
Tabelle 9 a-2:	LPS-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR2-/- Zellen) (II)
Tabelle 9 b-1:	PAM3CysSK4-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR4-/- Zellen) (I)
Tabelle 9 b-2:	PAM3CysSK4-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR4-/- Zellen) (II)
Tabelle 10 a:	Hyaluronidase-Verhalten in unterschiedlichen Medien (Nährlösung – RPMI1640) (pMC/TLR2-/- Zellen)
Tabelle 10 b:	Hyaluronidase-Verhalten in unterschiedlichen Medien (Nährlösung – RPMI1640) (pMC/TLR4-/- Zellen)
Tabelle 11 a:	Untersuchung der hitzebehandelten Hyaluronidase (I)

- Tabelle 11 b: Co-Inkubation der hitzeinaktivierten Hyaluronidase mit Polymyxin B
- Tabelle 12 a-1: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Enoxaparin (LMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR4-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und PAM3CysSK4 [100mg/ml]
- Tabelle 12 a-2: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Heparin (HMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR4-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und PAM3CysSK4 [100mg/ml]
- Tabelle 12 b-1: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Enoxaparin (LMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR4-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und PAM3CysSK4 [100mg/ml]
- Tabelle 12 b-2: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Heparin (HMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR2-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und PAM3CysSK4 [100mg/ml]
- Tabelle 13 a: Verdünnungsreihe Hyaluronidase bei Co-Inkubation mit Flagellin (pMC/TLR4-/- Zellen)
- Tabelle 13 b-1: Flagellin [1µg/ml] ohne Hyaluronidase (pMC/TLR4-/- Zellen)
- Tabelle 13 b-2: Verdünnungsreihe Flagellin bis [1µg/ml] mit Hyaluronidase [1mg/ml] (pMC/TLR4-/- Zellen)
- Tabelle 14 a-1: Verdünnungsreihe Poly(I:C) mit und ohne Hyaluronidase [1mg/ml] (pMC/TLR4-/- Zellen) (I)
- Tabelle 14 a-2: Verdünnungsreihe Poly(I:C) mit und ohne Hyaluronidase [1mg/ml] (pMC/TLR4-/- Zellen) (II)
- Tabelle 14 b: Einfluss von Heparin (HMW-Heparin) auf die die IL-6-Expression von pMC-TLR4-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und Poly(I:C) [10µg/ml]
- Tabelle 15 a-1: Einfluss des FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Systems auf pMC/TLR2-/- Zellen
- Tabelle 15 a-2: Einfluss des FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Systems auf pMC/TLR4-/- Zellen
- Tabelle 15 b-1: FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Analyse (pMC/TLR2-/- Zellen)
- Tabelle 15 b-2: FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Analyse (pMC/TLR4-/- Zellen) (I)
- Tabelle 15 b-3: FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Analyse (pMC/TLR4-/- Zellen) (II)

## 10 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Disaccharid-Wiederholungseinheit der Hyaluronsäure (-4GlcUA $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-)<sub>n</sub> [nach Edgar181]
- Abb. 2 Hyaluronsäuresynthese
- Abb. 3 Bindung der Hyaluronsäure an das CD44 der Maus [modifiziert nach Banerji et al., 2007]
- Abb. 4 Signalweg von Toll-like-Rezeptor [nach Takeda et al., 2003]
- Abb. 5 a Anordnung für die Messung der Flussgeschwindigkeit
- Abb. 5 b Verbindung Mikroliterpipette-Pipettenspitze
- Abb. 5 c Pipettenspitze
- Abb. 6 a Stimulation der pMC/TLR2-/- Zellen mit Hyaluronsäure <3000Da
- Abb. 6 b Stimulation der pMC/TLR4-/- Zellen mit Hyaluronsäure <3000Da
- Abb. 7 a-1 Co-Stimulation der pMC/TLR2-/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS bzw. PAM3CysSK4
- Abb. 7 a-2 Co-Stimulation der pMC/TLR2-/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS (I)
- Abb. 7 a-3 Co-Stimulation der pMC/TLR2-/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS (II)
- Abb. 7 b-1 Co-Stimulation der pMC/TLR4-/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS
- Abb. 7 b-2 Co-Stimulation der pMC/TLR4-/- Zellen mit Hyaluronsäure und PAM3CysSK4
- Abb. 8 a Hyaluronidase-Verdünnungsreihe bei gleichbleibender LPS-Konzentration (pMC/TLR2-/- Zellen)
- Abb. 8 b Hyaluronidase-Verdünnungsreihe bei gleichbleibender PAM3CysSK4-Konzentration (pMC/TLR4-/- Zellen)
- Abb. 9 a-1 LPS-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR2-/- Zellen) (I)
- Abb. 9 a-2 LPS-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR2-/- Zellen) (II)
- Abb. 9 b-1 PAM3CysSK4-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR4-/- Zellen) (I)
- Abb. 9 b-2 PAM3CysSK4-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR4-/- Zellen) (II)

- Abb. 10           Zusammenschau des Vergleiches unterschiedlicher Nährmedien bei Inkubation von pMC/TLR2-/- Zellen (links) und pMC/TLR4-/- Zellen (rechts) mit Hyaluronidase
- Abb. 11 a        Untersuchung der hitzebehandelten Hyaluronidase (I)
- Abb. 11 b        Viskositätsabschätzung nach 24 Stunden Inkubation (14 Stunden bei 22°C, 10 Stunden bei 4°C) nach Inkubation hochmolekularer Hyaluronsäure mit unbehandelter und hitzebehandelter Hyaluronidase
- Abb. 11 c        Co-Inkubation der hitzeinaktivierten Hyaluronidase mit Polymyxin B
- Abb. 12 a-1      Konzentrationsabhängiger Einfluss von Enoxaparin (LMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR4-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und PAM3CysSK4 [100mg/ml]
- Abb. 12 a-2      Konzentrationsabhängiger Einfluss von Heparin (HMW-Heparin) auf die die IL-6-Expression von pMC-TLR4-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und PAM3CysSK4 [100mg/ml]
- Abb. 12 b-1      Konzentrationsabhängiger Einfluss von Enoxaparin (LMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR2-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und LPS [100mg/ml]
- Abb. 12 b-2      Konzentrationsabhängiger Einfluss von Heparin (HMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR2-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und LPS [100mg/ml]
- Abb. 13 a        Verdünnungsreihe Hyaluronidase bei Co-Inkubation mit Flagellin (pMC/TLR4-/- Zellen)
- Abb. 13 b-1      Flagellin [1µg/ml] ohne Hyaluronidase (pMC/TLR4-/- Zellen)
- Abb. 13 b-2c     Verdünnungsreihe Flagellin bis [1µg/ml] mit Hyaluronidase [1mg/ml] (pMC/TLR4-/- Zellen)
- Abb. 14 a-1      Verdünnungsreihe Poly(I:C) mit und ohne Hyaluronidase [1mg/ml] (pMC/TLR4-/- Zellen) (I)
- Abb. 14 a-2      Verdünnungsreihe Poly(I:C) mit und ohne Hyaluronidase [1mg/ml] (pMC/TLR4-/- Zellen) (II)
- Abb. 14 b        Einfluss von Heparin (HMW-Heparin) auf die die IL-6-Expression von pMC-TLR4-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und Poly(I:C) [10µg/ml]
- Abb. 15 a-1      Einfluss des FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Systems auf pMC/TLR2-/- Zellen

- Abb. 15 a-2 Einfluss des FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Systems auf pMC/TLR4-/- Zellen
- Abb. 15 b-1 FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Analyse (pMC/TLR2-/- Zellen)
- Abb. 15 b-2 FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Analyse (pMC/TLR4-/- Zellen) (I)
- Abb. 15 b-3 FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Analyse (pMC/TLR4-/- Zellen) (II)
- Abb. 15 c-1 Abb. 15 c-2 Abschätzung der Viskosität nach Inkubation hochvisköser Hyaluronsäure mit FeSO<sub>4</sub> für 10 Tage

## 11 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
c.a.	circa
CD	cluster of differentiation
CDC37	cell division cycle 37
Da	Dalton
dsRNA	Doppelstrang-RNA (RNS, Ribonucleinsäure)
EDTA	Äthylen-Diamin-Tetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
evtl.	eventuell
f.ex.	for example
Fa.	Firma
ggf.	gegebenenfalls
GPT	Guanosin-Triphosphat
GTP-ase	Enzym zur Spaltung von GTP
HA	Hyaluronsäure, Hyaluronan
HA[L]	Hyaluronsäure 1500Da - 3000Da
HA[S]	Hyaluronsäure<1500Da
HABP	hyaluronan binding protein
HAS	Hyaluronsäure-Synthetase
HMW-HA	Hyaluronsäure hoher Molekülmasse
HYAL	Hyaluronidase
i.e.	id est
I.E.	internationale Einheiten
IgA	Immunglobulin A
IL-6	Interleukin 6
ITI	inter-alpha (globulin) inhibitor
kDA	Kilo-Dalton ; 1000Dalton
mRNA	messenger RNA (RNS)
l	Liter
LMW-HA	Hyaluronidase niedriger Molekülmasse

LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin, als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
NF-κB	nuclear factor κB
ng	Nanogramm
ns	nicht signifikant (95% Konfidenzintervall)
PAM	PAM3CysSK4
PAM3CysSK4	N-palmitoyl-S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R,S)-propyl)-(R)-cysteinyl-seryl-(lysyl)3-lysin
PDGF-BB	Platelet derived growth factor BB (beide Untereinheiten vom Typ B)
pg	Pikogramm
pMC	primäre Mesangialzelle
pMC/TLR2-/-	primäre Mesangialzelle der Mäuse, Knockout des toll-like-Rezeptors 2
pMC/TLR4-/-	primäre Mesangialzelle der Mäuse, Knockout des toll-like-Rezeptors 4
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, ein Signalprotein
Ras	<u>R</u> at <u>s</u> arcoma, ein Protoonkogen
RHAMM	receptor of hyaluronan mediated motility
RhoA	Ras homolog gene family member A, ein kleines GTP-ase-Protein
RNA (RNS)	Ribonucleinsäure
s	Sekunde
SPACR	<u>s</u> ialoprotein <u>a</u> ssociated with <u>c</u> ones and <u>r</u> ods
SPACRCAN	human interphotoreceptor matrix hyaluronan-binding proteoglycan
ssRNA	Einzelstrang-RNA (RNS, Ribonucleinsäure)
TGF-β1	transforming growth factor β1
TLR	toll like receptor
U	Units

u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µmol	Mikromol

## Anhang

Nachstehend sind die Tabellen zu den Grafiken im Kapitel „Ergebnisse“ aufgeführt. Im Rahmen der Statistik wurde der unpaare T-Test angewendet. Angegeben ist der p-Wert (Fehler erster Art). Die statistische Signifikanz wurde mit ns (nicht signifikant) sowie in der Graduierung der Signifikanz von \* bis \*\*\*\* angegeben.

Tabellen zu

### 4.2.1 Stimulation mit Hyaluronsäure < 3000Da

Tabelle zu **Abb. 6 a**

**Tabelle 6 a: Stimulation der pMC/TLR2-/- Zellen mit Hyaluronsäure <3000Da**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	6,86	5,20
LPS [5µg/ml]	1002,00	22,02
LPS [10µg/ml]	1064,00	16,85
PAM3CysSK4 [100ng/ml]	12,19	4,92
Hyaluronsäure <1500 Da [10µg/ml]	9,00	4,32
Hyaluronsäure 1500 Da - 3000 Da [10µg/ml]	4,23	0,79
Hyaluronsäure <1500 Da [50µg/ml]	5,58	1,89
Hyaluronsäure 1500 Da - 3000 Da [50µg/ml]	5,54	0,59

### T-Test zu Tabelle 6 a

		T-Test	
		p-Wert	
LPS [5µg/ml]	LPS [10µg/ml] +Hyaluronsäure<1500Da [50µg/ml]	0,0044	**
Kontrolle	PAM3CysSK4 [100ng/ml]	0,1870	ns

Tabelle zu **Abb. 6 b**

**Tabelle 6 b: Stimulation der pMC/TLR4-/- Zellen mit Hyaluronsäure <3000Da**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	5,10	4,50
LPS [5µg/ml]	4,21	3,17
LPS [10µg/ml]	2,27	1,26
PAM3CysSK4 [100ng/ml]	157,90	23,52
Hyaluronsäure <1500 Da [10µg/ml]	6,93	2,86
Hyaluronsäure 1500 Da - 3000 Da [10µg/ml]	3,10	1,47
Hyaluronsäure <1500 Da [50µg/ml]	2,50	0,86
Hyaluronsäure 1500 Da - 3000 Da [50µg/ml]	5,13	1,24

**T-Test zu Tabelle 6 b**

		T-Test p-Wert	
Kontrolle	Hyaluronsäure <1500 Da [10µg/ml]	0,5188	ns

Tabelle zu **Abb. 7 a-1**

**Tabelle 7 a-1: Co-Stimulation der pMC/TLR2-/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS bzw. PAM3CysSK4**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	40,70	5,18
LPS [1µg/ml]	982,30	39,24
PAM3CysSK4 [100ng/ml]	33,76	5,66
LPS [1µg/ml] +Hyaluronsäure<1500Da [50µg/ml]	1040,00	75,01
PAM3CysSK4[100ng/ml] +Hyaluronsäure<1500Da [50µg/ml]	21,39	2,36
LPS [1µg/ml] +Hyaluronsäure 1500Da - 3000Da [50µg/ml]	1000,00	55,68
PAM3CysSK4 [100ng/ml] +Hyaluronsäure 1500Da - 3000Da [50µg/ml]	30,59	5,97

**T-Test zu Tabelle 7 a-1**

		T-Test p-Wert	
LPS [1µg/ml]	LPS [1µg/ml] +Hyaluronsäure<1500Da [50µg/ml]	0,2193	ns
LPS [1µg/ml]	LPS [1µg/ml] +Hyaluronsäure>1500Da,<3000Da [50µg/ml]	0,621	ns

Tabelle zu **Abb. 7 a-2**

**Tabelle 7 a-2: Co-Stimulation der pMC/TLR2-/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	15,64	8,46
LPS [50ng/ml]	1160,00	17,91
LPS [50ng/ml]+Hyaluronsäure1500Da- 3000Da [50µg/ml]	1135,00	41,94

**T-Test zu Tabelle 7 a-2**

		T-Test p-Wert	
LPS [50ng/ml]	LPS [50ng/ml]+Hyaluronsäure1500Da- 3000Da [50µg/ml]	0,2176	ns

Tabelle zu **Abb. 7 a-3**

**Tabelle 7 a-3: Co-Stimulation der pMC/TLR2-/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	35,89	5,42
Hyaluronsäure<1500Da [50µg/ml]	32,26	2,74
LPS [50ng/ml]	763,00	24,82
LPS [50ng/ml]+Hyaluronsäure<1500Da [50µg/ml]	782,90	42,74

**T-Test zu Tabelle 7 a-3**

		T-Test p-Wert	
LPS [50ng/ml]	LPS [50ng/ml]+Hyaluronsäure<1500Da [50µg/ml]	0,3475	ns

Tabelle zu **Abb. 7 b-1**

**Tabelle 7 b-1: Co-Stimulation der pMC/TLR4/- Zellen mit Hyaluronsäure und LPS**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	7,09	2,31
LPS [5µg/ml]	3,25	0,83
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	56,90	4,45
LPS [5µg/ml] +Hyaluronsäure<1500Da [50µg/ml]	9,05	11,30
LPS [5µg/ml] +Hyaluronsäure 1500Da - 3000Da [50µg/ml]	5,28	5,63

**T-Test zu Tabelle 7 b-1**

		T-Test p-Wert	
LPS [5µg/ml]	LPS [5µg/ml] +Hyaluronsäure<1500Da [50µg/ml]	0,7461	ns

Tabelle zu **Abb. 7 b-2**

**Tabelle 7 b-2: Co-Stimulation der pMC/TLR4/- Zellen mit Hyaluronsäure und PAM3CysSK4**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	11,76	7,356
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	117,3	8,616
PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronsäure<1500Da [50µg/ml]	123,1	60,89
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+Hyaluronsäure 1500Da - 3000Da [50µg/ml]	150,7	22,09

**T-Test zu Tabelle 7 b-2**

		T-Test p-Wert	
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronsäure<1500Da [50µg/ml]	0,8236	ns
PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronsäure<1500Da [50µg/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronsäure 1500Da - 3000Da [50µg/ml]	0,3212	ns
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronsäure 1500Da - 3000Da [50µg/ml]	0,0063	**

Tabellen zu

#### 4.2.2 Die Wirkung von Hyaluronidase

Tabelle zu **Abb. 8 a**

**Tabelle 8 a: Hyaluronidase-Verdünnungsreihe beigleichbleibender LPS-Konzentration (pMC/TLR2-/- Zellen)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	0,08	0,06
LPS [50ng/ml]	171,20	34,24
LPS [50ng/ml] +Hyaluronidase [50µg/ml]	223,40	30,78
LPS [50ng/ml] +Hyaluronidase [300µg/ml]	241,20	13,29
LPS [50ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	570,70	39,59

#### T-Test zu Tabelle 8 a

		T-Test	
		p-Wert	
LPS [50ng/ml]	LPS [50ng/ml] +Hyaluronidase [50µg/ml]	0,0194	*
LPS [50ng/ml] +Hyaluronidase [50µg/ml]	LPS [50ng/ml] +Hyaluronidase [300µg/ml]	0,2241	ns
LPS [50ng/ml] +Hyaluronidase [300µg/ml]	LPS [50ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****
LPS [50ng/ml]	LPS [50ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****

Tabelle zu **Abb. 8 b**

**Tabelle 8 b: Hyaluronidase-Verdünnungsreihe bei gleich bleibender PAM3CysSK4-Konzentration (pMC/TLR4-/- Zellen)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	2,35	3,84
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	20,23	3,32
PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronidase [50µg/ml]	26,02	8,45
PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronidase [300µg/ml]	29,98	4,19
PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	52,55	5,85

**T-Test zu Tabelle 8 b**

		T-Test p-Wert	
		PAM3CysSK4 [50ng/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronidase [50µg/ml]
PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronidase [50µg/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronidase [300µg/ml]	0,3277	ns
PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronidase [300µg/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****

Tabelle zu **Abb. 9 a-1**

**Tabelle 9 a-1: LPS-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR2/- Zellen) (I)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	102,20	12,92
LPS [1ng/ml]	316,10	59,88
LPS [1ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	762,70	55,82
LPS [5ng/ml]	567,00	69,00
LPS [5ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	879,00	45,00
LPS [10ng/ml]	941,10	100,00
LPS [10ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	1061,00	113,30

**T-Test zu Tabelle 9 a-1**

		T-Test p-Wert	
LPS [1ng/ml]	LPS [1ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****
LPS [5ng/ml]	LPS [5ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****
LPS [10ng/ml]	LPS [10ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****

Tabelle zu **Abb. 9 a-2**

**Tabelle 9 a-2: LPS-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR2/- Zellen) (II)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	103,40	40,19
LPS [10ng/ml]	310,50	37,45
LPS [10ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	919,90	189,80
LPS [100ng/ml]	1209,00	142,00
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	1417,00	125,00
LPS [1µg/ml]	1712,00	220,10
LPS [1µg/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	3315,00	684,10

**T-Test zu Tabelle 9 a-2**

		T-Test p-Wert	
LPS [10ng/ml]	LPS [10ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****
LPS [100ng/ml]	LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	0,0226	*
LPS [1µg/ml]	LPS [1µg/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	0,0003	***

Tabelle zu **Abb. 9 b-1**

**Tabelle 9 b-1: PAM3CysSK4-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR4/- Zellen) (I)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	4,39	4,96
PAM3CysSK4 [1ng/ml]	17,11	1,63
PAM3CysSK4 [1ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	86,34	35,33
PAM3CysSK4 [5ng/ml]	81,51	24,26
PAM3CysSK4 [5ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	209,00	90,46
PAM3CysSK4 [10ng/ml]	124,80	22,21
PAM3CysSK4 [10ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	516,20	28,44

**T-Test zu Tabelle 9 b-1**

		T-Test p-Wert	
PAM3CysSK4 [1ng/ml]	PAM3CysSK4 [1ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	0,0007	***
PAM3CysSK4 [5ng/ml]	PAM3CysSK4 [5ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	0,0075	**
PAM3CysSK4 [10ng/ml]	PAM3CysSK4 [10ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****

Tabelle zu **Abb. 9 b-2**

**Tabelle 9 b-2: PAM3CysSK4-Verdünnungsreihe mit und ohne Hyaluronidase gleichbleibender Konzentration (pMC/TLR4-/- Zellen) (II)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	12,69	6,30
PAM3CysSK4 [100ng/ml]	814,10	58,26
PAM3CysSK4 [100ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	1265,00	38,19

**T-Test zu Tabelle 9 b-2**

		T-Test p-Wert	
PAM3CysSK4 [100ng/ml]	PAM3CysSK4 [100ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****

Tabellen zu **Abb. 10**

**Tabelle 10 a: Hyaluronidase-Verhalten in unterschiedlichen Medien (Nährlösung – RPMI1640) (pMC/TLR2-/- Zellen)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	43,97	29,98
Hyaluronidase [1mg/ml]	585,9	79,19
Hyaluronidase [1mg/ml] in RPMI 1640-Lösung	468,7	38,07

**T-Test zu Tabelle 10 a**

		T-Test p-Wert	
Hyaluronidase [1mg/ml]	Hyaluronidase [1mg/ml] in RPMI 1640-Lösung	0,0085	**
Kontrolle	Hyaluronidase [1mg/ml] in RPMI 1640-Lösung	<0,0001	****

Tabelle zu **Abb. 10** (gleiche Abbildung wie für die Tabelle zuvor)

**Tabelle 10 b: Hyaluronidase-Verhalten in unterschiedlichen Medien  
(Nährlösung – RPMI1640) (pMC/TLR4-/- Zellen)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	3,49	1,34
Hyaluronidase [1mg/ml]	1,48	0,91
Hyaluronidase [1mg/ml] in RPMI 1640-Lösung	0,62	0,44

**T-Test zu Tabelle 10 b**

		T-Test p-Wert	
Kontrolle	Hyaluronidase [1mg/ml]	0,0123	*
Hyaluronidase [1mg/ml]	Hyaluronidase [1mg/ml] in RPMI 1640-Lösung	0,0643	ns

Tabelle zu **Abb. 11 a**

**Tabelle 11 a: Untersuchung der hitzebehandelten Hyaluronidase (I)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	27,79	6,40
Hyaluronidase [1mg/ml]	578,40	43,28
Hyaluronidase [1mg/ml] 70°C, 30 min	360,50	41,14
Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C, 60 min	350,30	20,07
Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C, 60 min +Heparin 4375 I.E./ml	37,43	5,30

**T-Test zu Tabelle 11 a**

		T-Test p-Wert	
Kontrolle	Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****
Hyaluronidase [1mg/ml]	Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C, 60 min	<0,0001	****
Kontrolle	Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C, 60 min	<0,0001	****
Kontrolle	Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C, 60 min +Heparin 4375 I.E./ml	0,0175	*
Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C, 60 min	Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C, 60 min +Heparin 4375 I.E./ml	<0,0001	****

Tabelle zu **Abb. 11 c**

**Tabelle 11 b: Co-Inkubation der hitzeinaktivierten Hyaluronidase mit Polymyxin B**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	78,79	35,04
Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C 60 min	454,10	89,72
Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C 60 min +Polymyxin B [50µg/ml]	43,15	12,45
Polymyxin B [50µg/ml]	45,42	12,02

**T-Test zu Tabelle 11 b**

		T-Test p-Wert	
Kontrolle	Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C, 60 min	<0,0001	****
Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C, 60 min	Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C 60 min +Polymyxin B [50µg/ml]	<0,0001	****
Kontrolle	Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C 60 min +Polymyxin B [50µg/ml]	0,0408	*
Hyaluronidase [1mg/ml] 95°C 60 min +Polymyxin B [50µg/ml]	Polymyxin B [50µg/ml]	0,7541	ns

Tabellen zu

### 4.2.3 Der Einfluss von Heparinen

Tabelle zu **Abb. 12 a-1**

**Tabelle 12 a-1: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Enoxaparin (LMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR4/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und PAM3CysSK4 [100mg/ml]**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	12,69	6,30
PAM3CysSK4 [100ng/ml]	814,10	58,26
PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	1265,00	38,19
PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [16,7mg/ml]	10,30	2,33
PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [1,67mg/ml]	153,80	42,86
PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [167µg/ml]	875,80	179,00

**T-Test zu Tabelle 12 a-1**

		T-Test p-Wert	
PAM3CysSK4 [100ng/ml]	PAM3CysSK4 [100ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****
PAM3CysSK4 [100ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [16,7mg/ml]	<0,0001	****
PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [16,7mg/ml]	PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [1,67mg/ml]	<0,0001	****
PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [1,67mg/ml]	PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [167µg/ml]	<0,0001	****
PAM3CysSK4 [100ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [167µg/ml]	0,0004	***

Tabelle zu **Abb. 12 a-2**

**Tabelle 12 a-2: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Heparin (HMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR4-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und PAM3CysSK4 [100mg/ml]**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	8,84	2,58
PAM3CysSK4 [100ng/ml]	672,90	69,43
PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	990,90	68,31
PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [4167 I.E./ml]	11,22	2,40
PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [416,7 I.E./ml]	136,70	16,24
PAM3CysSK4 [100ng/m]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [41,67 I.E./ml]	703,90	329,30

**T-Test zu Tabelle 12 a-2**

		T-Test p-Wert	
PAM3CysSK4 [100ng/ml]	PAM3CysSK4 [100ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****
PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [4167 I.E./ml]	<0,0001	****
PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [4167 I.E./ml]	PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [416,7 I.E./ml]	<0,0001	****
PAM3CysSK4 [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [416,7 I.E./ml]	PAM3CysSK4 [100ng/m]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [41,67 I.E./ml]	0,0018	**
PAM3CysSK4 [100ng/ml] +Hyaluronidase [1mg/ml]	PAM3CysSK4 [100ng/m]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [41,67 I.E./ml]	0,0631	ns

Tabelle zu **Abb. 12 b-1**

**Tabelle 12 b-1: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Enoxaparin (LMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR4-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und PAM3CysSK4 [100mg/ml]**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle.	75,27	14,82
LPS [100ng/ml]	921,50	260,70
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	1228,00	125,70
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [16,7mg/ml]	106,80	9,82
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [1,67mg/ml]	344,50	90,87
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [167µg/ml]	910,40	291,60

**T-Test zu Tabelle 12 b-1**

		T-Test p-Wert	
LPS [100ng/ml]	LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	0,0266	*
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [16,7mg/ml]	<0,0001	****
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [16,7mg/ml]	LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [1,67mg/ml]	<0,0001	****
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [1,67mg/ml]	LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [167µg/ml]	0,0011	**
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Enoxaparin [167µg/ml]	0,0340	*

Tabelle zu **Abb. 12 b-2**

**Tabelle 12 b-2: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Heparin (HMW-Heparin) auf die IL-6-Expression von pMC-TLR2/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und PAM3CysSK4 [100mg/ml]**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle.	28,65	5,50
LPS [100ng/ml]	692,00	190,30
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	974,10	50,69
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [4167 I.E./ml]	101,00	4,29
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [416,7 I.E./ml]	170,10	59,88
LPS [100ng/ml] + Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [41,67 I.E./ml]	446,40	141,80

**T-Test zu Tabelle 12 b-2**

		T-Test p-Wert	
LPS [100ng/ml]	LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	0,0056	**
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [4167 I.E./ml]	<0,0001	****
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [4167 I.E./ml]	LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [416,7 I.E./ml]	0,0182	*
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [416,7 I.E./ml]	LPS [100ng/ml] + Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [41,67 I.E./ml]	0,0013	**
LPS [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	LPS [100ng/ml] + Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [41,67 I.E./ml]	<0,0001	****

Tabellen zu

#### 4.2.4 Stimulation mit Flagellin

Tabelle zu **Abb. 13 a**

**Tabelle 13 a: Verdünnungsreihe Hyaluronidase bei Co-Inkubation mit Flagellin (pMC/TLR4-/- Zellen)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	26,53	2,15
Flagellin [200ng/ml]	27,66	4,17
Flagellin [200ng/ml] + Hyaluronidase [50µg/ml]	46,60	15,86
Flagellin [200ng/ml] + Hyaluronidase [300µg/ml]	140,20	11,39
Flagellin [200ng/ml] + Hyaluronidase [1mg/ml]	265,20	74,36

**T-Test zu Tabelle 13 a**

		T-Test p-Wert	
Kontrolle	Flagellin [200ng/ml]	0,5654	ns
Flagellin [200ng/ml]	Flagellin [200ng/ml] + Hyaluronidase [50µg/ml]	0,0179	*
Flagellin [200ng/ml] + Hyaluronidase [50µg/ml]	Flagellin [200ng/ml] + Hyaluronidase [300µg/ml]	<0,0001	****
Flagellin [200ng/ml] + Hyaluronidase [300µg/ml]	Flagellin [200ng/ml] + Hyaluronidase [1mg/ml]	0,0022	**
Flagellin [200ng/ml]	Flagellin [200ng/ml] + Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****

Tabelle zu **Abb. 13 b-1**

**Tabelle 13 b-1: Flagellin [1µg/ml] ohne Hyaluronidase (pMC/TLR4-/- Zellen)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	3,73	0,88
Flagellin [1µg/ml]	3,06	1,08
Flagellin [1µg/ml] + Heparin [4167 I.E./ml]	0,78	0,46

**T-Test zu Tabelle 13 b-1**

		T-Test p-Wert	
		Kontrolle	Flagellin [1µg/ml]
Flagellin [1µg/ml]	Flagellin [1µg/ml] + Heparin [4167 I.E./ml]	0,0008	***

**Tabelle zu Abb. 13 b-2**

**Tabelle 13 b-2: Verdünnungsreihe Flagellin bis [1µg/ml] mit Hyaluronidase [1mg/ml] (pMC/TLR4-/- Zellen)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1,62	0,56
Hyaluronidase [1mg/ml]+Flagellin [25ng/ml]	23,13	3,19
Hyaluronidase [1mg/ml]+Flagellin [100ng/ml]	18,55	1,03
Hyaluronidase [1mg/ml]+Flagellin [1µg/ml]	42,43	4,12

**T-Test zu Tabelle 13 b-2**

		T-Test p-Wert	
		Kontrolle	Hyaluronidase [1mg/ml]+Flagellin [25ng/ml]
Kontrolle	Hyaluronidase [1mg/ml]+Flagellin [100ng/ml]	<0,0001	****
Hyaluronidase [1mg/ml]+Flagellin [25ng/ml]	Hyaluronidase [1mg/ml]+Flagellin [100ng/ml]	0,0075	**
Hyaluronidase [1mg/ml]+Flagellin [25ng/ml]	Hyaluronidase [1mg/ml]+Flagellin [1µg/ml]	<0,0001	****

Tabellen zu

#### 4.2.5 Stimulation mit Poly(I:C)

Tabelle zu **Abb. 14 a-1**

**Tabelle 14 a-1: Verdünnungsreihe Poly(I:C) mit und ohne Hyaluronidase [1mg/ml] (pMC/TLR4-/- Zellen) (I)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	133,5	24,82
Poly(I:C) [1ng/ml]	64,64	11,74
Poly(I:C) [1ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	272,90	10,59
Poly(I:C) [10ng/ml]	45,28	19,36
Poly(I:C) [10ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	283,00	17,45
Poly(I:C) [100ng/ml]	69,91	11,16
Poly(I:C) [100ng/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	350,70	35,21

**T-Test zu Tabelle 14 a-1**

		T-Test p-Wert	
		Kontrolle	Poly(I:C) [100ng/ml]
Poly(I:C) [1ng/ml]	Hyaluronidase [1mg/ml]+Flagellin [100ng/ml]	<0,0001	****
Poly(I:C) [10ng/ml]	Hyaluronidase [1mg/ml]+Flagellin [100ng/ml]	<0,0001	****
Poly(I:C) [100ng/ml]	Hyaluronidase [1mg/ml]+Flagellin [1µg/ml]	<0,0001	****

Tabelle zu **Abb. 14 a-2**

**Tabelle 14 a-2: Verdünnungsreihe Poly(I:C) mit und ohne Hyaluronidase [1mg/ml] (pMC/TLR4-/- Zellen) (II)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	23,88	4,76
Poly(I:C) [1µg/ml]	84,00	17,93
Poly(I:C) [1µg/ml] + Hyaluronidase [1mg/ml]	156,80	22,05
Poly(I:C) [10µg/ml]	96,20	4,94
Poly(I:C) [10µg/ml] + Hyaluronidase [1mg/ml]	591,20	153,70

**T-Test zu Tabelle 14 a-2**

		T-Test p-Wert	
Kontrolle	Poly(I:C) [1µg/ml]	<0,0001	****
Poly(I:C) [1µg/ml]	Poly(I:C) [1µg/ml] + Hyaluronidase [1mg/ml]	0,0001	***
Poly(I:C) [10µg/ml]	Poly(I:C) [10µg/ml] + Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****

Tabelle zu **Abb. 14 b**

**Tabelle 14 b: Einfluss von Heparin (HMW-Heparin) auf die die IL-6-Expression von pMC-TLR4-/- Zellen bei Co-Inkubation mit Hyaluronidase [1mg/ml] und Poly(I:C) [10µg/ml]**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	23,88	4,76
Poly(I:C) [10µg/ml]	96,20	4,94
Poly(I:C) [10µg/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	591,20	153,70
Poly(I:C) [10µg/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [4375 I.E./ml]	8,18	2,69

**T-Test zu Tabelle 14 b**

		T-Test p-Wert	
		Kontrolle	Poly(I:C) [10µg/ml]
Poly(I:C) [10µg/ml]	Poly(I:C) [10µg/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	<0,0001	****
Poly(I:C) [10µg/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml]	Poly(I:C) [10µg/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [4375 I.E./ml]	<0,0001	****
Kontrolle	Poly(I:C) [10µg/ml]+Hyaluronidase [1mg/ml] +Heparin [4375 I.E./ml]	<0,0001	****

Tabellen zu

**4.2.6 Der Einfluss von Radikalen (System aus FeSO<sub>4</sub> und EDTA)**

Tabelle zu **Abb. 15 a-1**

**Tabelle 15 a-1: Einfluss des FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Systems auf pMC/TLR2/- Zellen**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	5,11	0,86
Vitamin C [1mmol/l]	11,06	1,29
FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]	2,27	2,57
FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	0,03	0,00
LPS [50ng/ml]	395,20	60,38
LPS [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]	93,04	12,55
LPS [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml] +Vitamin C [1mmol/l]	63,33	13,16
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	5,38	3,10
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+Fe [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]	2,50	2,50
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+Fe [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	0,17	0,00

**T-Test zu Tabelle 15 a-1**

		T-Test p-Wert	
Kontrolle	Vitamin C [1mmol/l]	0,0003	***
Kontrolle	PAM3CysSK4 [50ng/ml]	0,8700	ns
LPS [50ng/ml]	LPS [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]	<0,0001	****
LPS [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]	LPS [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml] +Vitamin C [1mmol/l]	0,0171	*

Tabelle zu **Abb. 15 a-2**

**Tabelle 15 a-2: Einfluss des FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Systems auf pMC/TLR4/- Zellen**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	2,38	0,33
FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]	2,12	0,91
FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	2,99	0,72
Vitamin C [1mmol/l]	3,00	2,15
LPS [50ng/ml]	1,57	0,33
LPS [50ng/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	1,89	0,46
LPS [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]	2,29	0,52
LPS [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml] +Vitamin C [1mmol/l]	1,08	0,40
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	42,15	5,55
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	52,12	2,15
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]	17,29	1,56
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]+ Vitamin C [1mmol/l]	4,01	0,83

**T-Test zu Tabelle 15 a-2**

		T-Test	
		p-Wert	
Kontrolle	LPS [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	0,5892	ns
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	0,0155	*
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]	0,0001	***
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+EDTA [253µg/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	<0,0001	****

**Tabelle zu Abb. 15 b-1**

**Tabelle 15 b-1: FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Analyse (pMC/TLR2-/- Zellen)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	3,29	0,57
EDTA [253µg/ml]	1,54	0,44
EDTA [253µg/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	2,49	0,53
FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]	0,61	0,25
FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	0,54	0,21
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	3,11	0,75
LPS [50ng/ml]	107,00	40,79
LPS [50ng/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	129,10	6,39
LPS [50ng/ml]+EDTA [253µg/ml]	329,00	13,86
LPS [50ng/ml]+EDTA [253µg/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	413,40	8,63
LPS [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]	22,29	3,70
LPS [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	17,87	2,47

**T-Test zu Tabelle 15 b-1:**

		T-Test	
		p-Wert	
LPS [50ng/ml]	LPS [50ng/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	0,3256	ns
LPS [50ng/ml]	LPS [50ng/ml]+EDTA [253µg/ml]	< 0,0001	****
LPS [50ng/ml]	LPS [50ng/ml]+EDTA [253µg/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	< 0,0001	****
LPS [50ng/ml]	LPS [50ng/ml]+EDTA [253µg/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	< 0,0001	****
LPS [50ng/ml]	FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]	0,0061	**
FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]	FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	0,0939	ns

**Tabelle zu Abb. 15 b-2**

**Tabelle 15 b-2: FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Analyse (pMC/TLR4-/- Zellen) (I)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	3,88	1,63
FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	0,85	0,61
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	131,80	16,06
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+Vitamin C [1mmol/l]	215,00	37,92
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+EDTA [253µg/ml]	137,30	8,59
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+EDTA [253µg/ml] +Vitamin C [1mmol/l]	226,00	24,81
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]	18,03	4,02
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml] +Vitamin C [1mmol/l]	10,50	3,68

**T-Test zu Tabelle 15 b-2**

		T-Test p-Wert	
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml] +Vitamin C [1mmol/l]	0,0006	***
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml] +EDTA [253µg/ml]	0,4752	ns
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml]+EDTA [253µg/ml] +Vitamin C [1mmol/l]	<0,0001	****
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]	<0,0001	****
PAM3CysSK4 [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]	PAM3CysSK4 [50ng/ml]+ FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml] +Vitamin C [1mmol/l]	0,0069	**

Tabelle zu **Abb. 15 b-3**

**Tabelle 15 b-3: FeSO<sub>4</sub>-EDTA-Analyse (pMC/TLR4-/- Zellen) (II)**

	IL-6 Expression in [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	0,09	0,10
FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]	2,34	2,25
PAM3CysSK4 [50ng/ml]	28,73	3,06

**T-Test zu Tabelle 15 b-3**

		T-Test p-Wert	
Kontrolle	FeSO <sub>4</sub> [267µg/ml]	0,0925	ns

## Danksagung

Mein Dank gebührt *Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders* aus der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit in seinem Labor sowie *Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fred Sinowatz* für die Übernahme der Arbeit an die Tiermedizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ich empfand es nicht nur als außergewöhnlich, sondern auch als extrem motivierend, dass *Herr Prof. Anders* mich meine Gedanken, auf Grund der Literaturrecherche, so frei umsetzen ließ. Die unkomplizierte Weise, in der mir *Herr Prof. Sinowatz* bei der Übernahme der Arbeit an die Tiermedizinische Fakultät entgegenkam und die Hilfestellungen, welche mir *Herr Prof. Sinowatz* wiederholt zuteil werden ließ, waren in meinen Augen äußerst wertvoll.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Labors für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken. Einerseits sind die sehr gründliche und effiziente Einarbeitung in die Labormethoden sowie die permanente Ansprechbarkeit aller Mitarbeiter des Labors bei Rückfragen herauszustellen, andererseits hat die ausgesprochen angenehme Atmosphäre, in welcher ich arbeiten durfte, sehr zur Produktivität beigetragen.

Nicht zuletzt möchte ich mich herzlich bei *Fr. Ewa Radomska* und *Fr. Katharina Witt* für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei der Beschaffung der für die Arbeit notwendigen Materialien bedanken.