

Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

Die Expression von CD44 in murinen Multiple Sklerose Tiermodellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Nicolas Pröbstl

aus
München

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Frank Weber

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Tanja Hochstrasser

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2018

Für meine Familie und Freunde

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	4
------------------------------	----------

II. Abkürzungsverzeichnis	6
----------------------------------	----------

1. Einleitung	8
----------------------	----------

1.1 Die Multiple Sklerose	8
----------------------------------	----------

1.2 Verwendete Tiermodelle	10
-----------------------------------	-----------

1.2.1 Das Cuprizon-Modell	10
---------------------------	----

1.2.2 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	12
---	----

1.2.3 Das Cup-EAE-Modell	14
--------------------------	----

1.2.4 Das LPC-Modell	15
----------------------	----

1.3 Der Hyaluronsäurerezeptor - CD44	16
---	-----------

1.4 Fragestellung	21
--------------------------	-----------

2. Material und Methoden	22
---------------------------------	-----------

2.1 Materialien und Chemikalien	22
--	-----------

2.2 Puffer, Blockseren und Färbelösungen	23
---	-----------

2.3 Versuchstiere	24
--------------------------	-----------

2.4 Versuchsaufbau	25
---------------------------	-----------

2.5 Durchführung der Versuche und Materialgewinnung	26
--	-----------

2.6 Färbungen	27
----------------------	-----------

2.6.1 Immunhistochemische Färbungen	27
-------------------------------------	----

2.6.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen	28
---	----

2.7 Auswertung	32
-----------------------	-----------

2.7.1 Untersuchte Hirnregionen	32
--------------------------------	----

2.7.2 Beurteilung der CD44-Expression	33
---------------------------------------	----

2.7.3 Statistische Auswertung	34
-------------------------------	----

3. Ergebnisse	35
3.1 Erhöhte CD44-Expression bei fortlaufend toxisch induzierter Demyelinisierung ohne T-Zell Beteiligung	35
3.2 Erhöhte CD44-Expression bei aktiver EAE-Immunsierung mit T-Zell Beteiligung	47
3.3 Erhöhte CD44-Expression nach toxisch induzierter Demyelinisierung in Kombination mit einer aktiven EAE-Immunsierung	51
3.4 Erhöhte CD44-Expression nach direkter LPC-Injektion in das paramediane Corpus callosum	56
4. Diskussion	58
4.1 Tiermodelle der Multiplen Sklerose und Ihre Grenzen	58
4.2 Ist CD44 mehr als nur ein Hyaluronsäurerezeptor?	60
4.3 Die Rolle von CD44 bei inflammatorischen Prozessen des ZNS und neurodegenerativen Erkrankungen	62
5. Zusammenfassung	70
III. Abbildungsverzeichnis	71
IV. Tabellenverzeichnis	73
V. Literaturverzeichnis	74
VI. Eidesstattliche Versicherung	86
VII. Danksagung	87

II. Abkürzungsverzeichnis

§	Paragraph
%	Prozent
°C	Grad Celsius
AK	Antikörper
AT-EAE	adoptive transfer-experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD44	cluster of differentiation 44
CD44s	Standard CD44-Protein
CD44v	CD44-Isotyp-Varianten
CI	Capsula interna
CNPase	2,3-zyklische Nukleotid-3-Phosphodiesterase
Co	Kontrolle (engl. Control)
Cup	Cuprizon
d	Tag/e
DMT	Disease Modifying Therapy
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECMRIII	extrazellulärer Matrixrezeptor III
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	et alia
EZM	extrazelluläre Matrixglykoproteine
Fx	Fornix hippocampi
g	Gramm
gem.	gemäß
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HCAM	Homing-Cell-Adhesion-Molecule
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
H-Färbung	Hämatoxylin-Färbung
HHV	humanes Herpesvirus
HHV-4	humanes Herpesvirus Typ 4
HHV-6A	humanes Herpesvirus Typ 6A
HIER	heat induced epitope retrieval
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish peroxidase)
HS	Hyaluronsäure

Hutch-1	Hyaluron-Rezeptor-1
kDa	Kilodalton
KFA	komplettes Freund-Adjuvans
l	Liter
LCC	laterales Corpus callosum
LPC	Lysophosphatidylcholin
MBP	Myelin-Basisches-Protein
mCC	mediales Corpus callosum
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Protein
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
PBS	Phosphatpufferlösung
Pgp-1	phagozytotisches Glykoprotein 1
PLP	Proteolipid-Protein
pMcx	primär somatomotorischer Kortex
PPMS	primär-progrediente MS (engl. primary-progressive MS)
pScx	primär somatosensorischer Kortex
PTX	Pertussis Toxin
ROI	region of interest
RRMS	schubförmig-remittierende MS (engl. relapsing-remitting MS)
SEM	Standard Error of the Mean
sog.	sogenannt
SPMS	sekundäre-progrediente MS (engl. secondary-progressive MS)
TierSchG	Tierschutzgesetz
TMEV	Theiler-Murin-Enzephalomyelitis-Virus
USA	United States of America
vgl.	vergleiche
VLS	Vascular-Leak-Syndrom
WF	Wachstumsfaktoren
ZNS	Zentralnervensystem
Zy	Zytokine
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1. Einleitung

1.1 Die Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (Encephalomyelitis disseminata, MS) ist eine erworbene, chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Sowohl in Bereichen der weißen als auch der grauen Substanz des ZNS kommt es zur Ausbildung von entzündlichen Läsionen, die sich zu Beginn der Krankheit, je nach Lokalisation, durch neurologische Ausfälle wie Seh- oder Sensibilitätsstörungen äußern können.

Die Prävalenz der MS variiert länderspezifisch sehr stark, ist jedoch bei jungen Erwachsenen aus Kanada, Europa und den USA mit 100-200 Fällen auf 100.000 Einwohner (0,15%) die häufigste neurologische Erkrankung überhaupt. Insgesamt sind Frauen öfter betroffen als Männer (1,6 : 1), und der Zeitpunkt der Erstdiagnose liegt zwischen dem 20.-40. Lebensjahr (Keegan & Noseworthy, 2002; M. Kipp & Beyer, 2009).

Die Erkrankung wurde erstmals 1849 durch den deutschen Arzt Friedrich Theodor von Friedrichs diagnostiziert. Eine erste exakte Beschreibung der klinischen Symptomatik und pathologischen Charakteristika folgte 1868 durch den Neurologen Jean-Martin Charcot an der Salpêtrière-Klinik in Paris (Besser & Krämer, 2006).

Wie in Abbildung 1 gezeigt, unterscheidet man grundsätzlich zwischen 3 verschiedenen Verlaufsformen der Erkrankung.

Die schubförmig-remittierende Form der MS (RRMS) wird bei 85% der Betroffenen initial diagnostiziert. Diese ist durch plötzlich auftretende neuronale Dysfunktionen (sog. Schübe), die sich je nach Lokalisation der Läsionen im ZNS unterschiedlich äußern können, charakterisiert. Patienten zeigen bei dieser Form der MS nach einigen Wochen und Monaten eine partielle oder vollständige Remission.

Zwischen den Schüben ist das Ausmaß der klinischen

Beeinträchtigung der Patienten stabil und die Symptome verschlechtern sich nicht weiter (Plateauphasen). Im späteren Verlauf geht die Erkrankung bei einem Großteil der Betroffenen in die sekundär-progrediente Form der MS (SPMS) über. Diese ist durch eine progressive Zunahme der neuronalen Dysfunktionen gekennzeichnet, die zusätzlich durch einzelne Schübe verstärkt werden können.

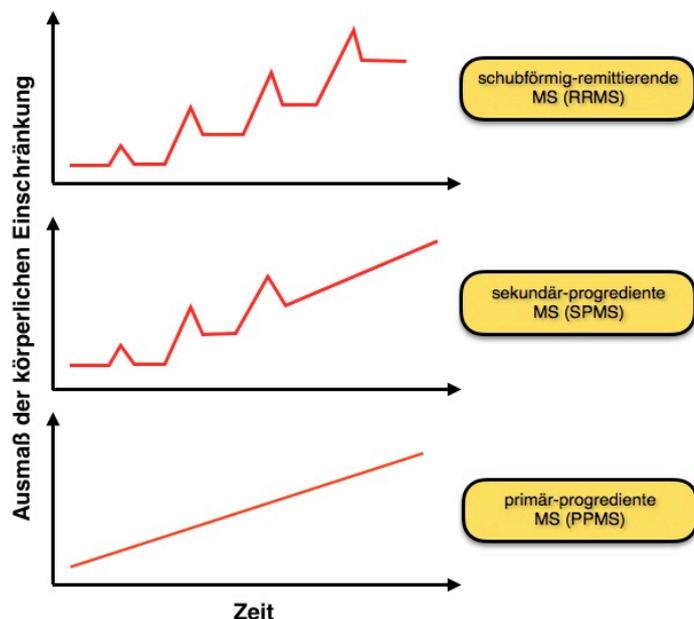


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.

Bei in etwa 15% der MS-Patienten wird initial die primär-progrediente (PPMS) Verlaufsform diagnostiziert. Hierbei nimmt die Intensität der Beschwerden kontinuierlich bei fortschreitendem Krankheitsverlauf zu (Keegan & Noseworthy, 2002; Markus Kipp & Baumgartner, 2011).

Aufgrund der starken Heterogenität der Erkrankung konnte die genaue Ursache bis heute nicht geklärt werden (Lassmann, Bruck, & Lucchinetti, 2001).

Eine genetische Prädisposition kann MS begünstigen, ist aber nicht der alleinige Auslöser. Untersuchungen zeigten, dass nur bei 25-30% aller eineiigen Zwillinge beide an MS erkranken. Bei zweieiigen Zwillingen liegt die Wahrscheinlichkeit nur noch bei 3-5%. (Keegan & Noseworthy, 2002).

Daher wird vermutet, dass neben genetischen Faktoren auch zahlreiche Umwelteinflüsse wie Infektionen, Sonnenlichtexposition oder das Rauchen wichtige Prädilektionsfaktoren der MS darstellen. Beobachtungen, dass die Häufigkeit an MS-Erkrankungen in Ländern mit zunehmendem Abstand zum Äquator zunimmt, sprechen dafür, dass eine geringere Sonnenexposition Auswirkungen auf die Entwicklung der MS hat. Beispielsweise zeigten Untersuchungen, dass Zwillinge die einer stärkeren Sonneneinstrahlung ausgesetzt waren ein geringeres Risiko haben an MS zu erkranken (Islam, Gauderman, Cozen, & Mack, 2007). Dies begründen Studien mit der Vitamin D-Hypothese. Diese besagt, dass Patienten mit einem höheren Vitamin D-Spiegel im Blut ein geringeres Risiko haben, an MS zu erkranken (Grant, 2006; Markus Kipp & Baumgartner, 2011).

Auch humane Herpesviren (HHV) wie das Epstein-Barr-Virus (EBV, HHV-4) oder HHV-6A stehen im Verdacht MS auszulösen oder zumindest das Risiko einer Erkrankung zu erhöhen (Infektionstheorie). Studien zeigten, dass eine EBV-Infektion das Risiko an MS zu erkranken signifikant steigert und MS-Patienten eher eine EBV-Seropositivität aufweisen als gesunde Menschen (Fernandez-Menendez, Fernandez-Moran, Fernandez-Vega, Perez-Alvarez, & Villafani-Echazu, 2016; Fierz, 2017).

Die oben genannten Prädilektionsfaktoren beschreiben nur einen kleinen Teil des pathophysiologischen Ursachenkomplexes der MS.

Um die Heterogenität und Komplexität der pathologischen Mechanismen der MS besser verstehen zu können, bedient man sich verschiedener experimenteller Tiermodelle. Diese helfen sowohl De- und Remyelinisierungsprozesse als auch entzündliche und neurodegenerative Vorgänge besser verstehen zu können. Das am häufigsten verwendete Tiermodell in der MS-Forschung ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Aber auch andere Tiermodelle wie das Cuprizin-Modell, das Lysophosphatidylcholin (LPC)-Modell, sowie das von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Cup-EAE-Modell, dienen zur genaueren Untersuchung der MS und ihrer heterogenen Pathologie (M. Kipp, Clarner, Dang, Copray, & Beyer, 2009; Lassmann & Bradl, 2017; Scheld et al., 2016).

1.2 Verwendete Tiermodelle

1.2.1 Das Cuprizin-Modell

Das Cuprizin-Modell gehört zur Gruppe der toxischen Tiermodelle und dient zur Untersuchung von De- und Remyelinisierungsprozessen bei intakter Blut-Hirn-Schranke ohne T-Zell-Beteiligung (Bakker & Ludwin, 1987).

Erstmals beschrieb Gustav Nilsson 1950 den Kupferchelator Cuprizin (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon) als Kondensationsprodukt aus Oxalylhydraziden und Cyclohexanon (siehe Strukturformel Abbildung 2). Seine Wirkung wurde erstmals in Tierversuchen durch William W. Carlton in den 1960 Jahren untersucht. Carlton stellte bereits damals fest, dass es bei behandelten Tieren (Ratten, Meerschweinchen und Mäusen) nach Cuprizin-

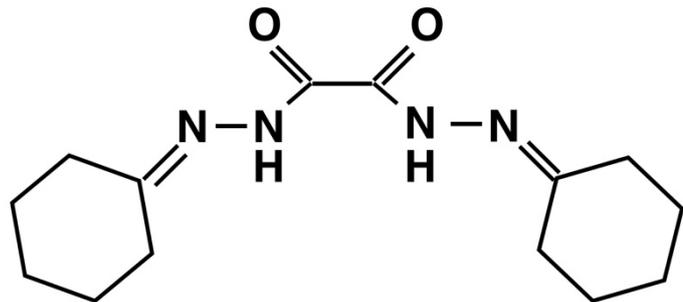


Abbildung 2: Strukturformel von Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon (Cuprizin)

Intoxikation neben der Bildung von Läsionen im ZNS auch zu Begleitreaktionen wie Ödemen, Hydrocephalus und Mikrogliaaktivierung kommt (Carlton, 1966, 1967, 1969).

In den darauffolgenden Jahrzehnten erfolgten weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet unter Verwendung von unterschiedlichen Mäusestämmen (Albino, BALB/cJ, BSVS, CD1, ICI, SJL, Swiss) (Praet, Guglielmetti, Berneman, Van der Linden, & Ponsaerts, 2014).

Diese Studien zeigten, dass neben der Dosierung und Dauer der Cuprizin-Intoxikation auch Stamm, Geschlecht, Gewicht und Alter der Versuchstiere entscheidend für die Ergebnisse einer Studie waren (Gudi, Gingele, Skripuletz, & Stangel, 2014). Beispielsweise führt die Cuprizin-Intoxikation bei Mäusen der Stämme SJL und BALB/cJ zur Demyelinisierung, welche sich in der Lokalisation und der Intensität von der des Stammes C57BL/6 deutlich unterscheiden (Skripuletz et al., 2008; Taylor, Gilmore, & Matsushima, 2009).

Die Beimischung von 0,2-0,25% Cuprizin in das Normalfutter von Mäusen des Stammes C57BL/6 verursacht eine reproduzierbare und synchrone Demyelinisierung des ZNS (akute Demyelinisierung), bei gleichzeitig minimaler Toxizität (Hepatotoxizität) für die Versuchstiere. Eine 5-6-wöchige Cuprizin-Intoxikation führt nachweislich zu einer vollständigen Demyelinisierung des medialen *Corpus callosums* (Hiremath et al., 1998).

Anfangs ging man davon aus, dass sich der Verlust der Myelinscheide nach Cuprizin-Intoxikation primär auf die weiße Substanz im Bereich des medialen *Corpus callosums* und dem *Pedunculus cerebellaris superior* beschränkt (Torkildsen, Brunborg, Myhr, & Bø, 2008). Neuere Studien hingegen zeigen, dass es auch im Bereich des Kortex (primär somatosensorischer und somatomotorischer Kortex) (Markus Kipp & Baumgartner, 2011),

dem Hippocampus (Norkute et al., 2009), dem Cerebellum (Groebe et al., 2009) und in Teilen der Basalganglien (Pott et al., 2009) zur Bildung von Cuprizon-induzierten Läsionen kommt. Erfolgt die Cuprizon-Intoxikation für 5 Wochen spricht man von einer akuten Demyelinisierung. Hierbei kommt es nach Absetzen des Kupferchelators Cuprizon zu Remyelinisierungsvorgängen (M. Kipp et al., 2009), welche sich auf molekularer Ebene durch die Expression von Myelinproteinen (2,3-zyklische Nukleotid-3-Phosphodiesterase (CNPase), Myelin-Basisches-Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Protein (MOG), Proteolipid-Protein (PLP) belegen lassen (Lindner et al., 2008).

Wird Cuprizon für 12 Wochen oder länger verabreicht, spricht man von einer chronischen Demyelinisierung der betroffenen Regionen, Remyelinisierungsprozesse lassen sich nach dieser Zeit nur noch eingeschränkt oder gar nicht mehr beobachten (M. Kipp et al., 2009).

Der genaue Wirkungsmechanismus von Cuprizon auf den Organismus der Versuchstiere ist noch nicht vollständig geklärt. Erstmals wurden 1969 nach Cuprizon-Intoxikation Riesensomitochondrien in der Leber beschrieben (Suzuki, 1969), welche 1972 auch in Oligodendrozyten von behandelten Tieren nachgewiesen werden konnten (Blakemore, 1972). Die Beobachtungen bestärken die Hypothese, dass der Kupferchelator Cuprizon Einfluss auf den mitochondrialen Stoffwechsel nimmt, da Kupfer essentieller Bestandteil von Metalloenzymen der mitochondrialen Atmungskette ist. Dazu gehören unter anderem die Cytochromoxidasen als wichtiger Faktor der oxidativen Phosphorylierung. Die Störung der Atmungskette und der daraus resultierende Energiemangel führen letztendlich zur Apoptose der Oligodendrozyten und der damit verbundenen Demyelinisierung (Matsushima & Morell, 2001).

Welche Mechanismen genau zu einer Oligodendrozytenapoptose führen, konnte noch nicht abschließend geklärt werden, Cuprizon-Intoxikation führt jedoch nachweislich zu „Oxidativem-Stress“ (Praet et al., 2014).

Neben der Oligodendrozytenapoptose kommt es abhängig von Konzentration und Dauer der Cuprizon-Intoxikation sowohl zu einer Mikrogliaaktivierung als auch zu einer Astroglie in den demyelinisierten Regionen (Hiremath et al., 1998).

Die oben beschriebenen Eigenschaften machen das Cuprizon-Modell zu einem wichtigen Tiermodell in der MS-Forschung.

1.2.2 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist das am häufigsten verwendete Tiermodell zur Erforschung neuroinflammatorischer Erkrankungen wie der MS und ist ein essentieller Bestandteil bei der Entwicklung von DMT's (engl. Disease Modifying Therapies) (Baxter, 2007; Constantinescu, Farooqi, O'Brien, & Gran, 2011; M. Kipp, Nyamoya, Hochstrasser, & Amor, 2017).

Den Grundstein dieses Tiermodells legte Louis Pasteur im Jahr 1885 durch die Entwicklung der ersten Tollwutimpfung. Pasteur infizierte Kaninchen mit dem Rabiesvirus und entnahm nach einiger Zeit das Rückenmark der erkrankten Tiere, trocknete es und verabreichte es anschließend seinen Patienten als Impfstoff. Frühe Erfolge dieser Impfung schafften Vertrauen in der Bevölkerung, sodass zwischen den Jahren 1885 – 1887 ca. 5000 Patienten geimpft wurden. Neben positiven Erfahrungen kam es aber auch zu postvakzinalen Lähmungserscheinungen. Diese begannen in den Beinen und führten in 30% der Fälle durch Lähmung der Atemmuskulatur zum Tode der betroffenen Patienten (Baxter, 2007).

In den 1920er Jahren zeigten Kortischoner und Schweinburg, dass menschliches Rückenmarkshomogenisat bei Kaninchen zur Ausbildung einer Paralyse führt (Kortischoner & Schweinburg, 1925).

Aufgrund dieser Erkenntnisse vermutete Thomas M. Rivers, ein Virologe der Rockefeller Universität, Parallelen zwischen postvakzinalen Komplikationen und einer Infektion des ZNS durch Viren. Rivers immunisierte sowohl Kaninchen als auch Rhesusaffen mit ZNS-Homogenat, woraufhin diese postvakzinalen Symptome, vorwiegend Muskelschwächen, entwickelten und sich nur noch mühsam fortbewegen konnten. Auf histopathologischer Ebene zeigte sich eine Enzephalomyelitis in Form von perivaskulären Infiltraten und Demyelinisierungen im gesamten ZNS. In weiteren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von ZNS-spezifischen Antikörpern (AK) und der Demyelinisierung bei Versuchstieren hergestellt werden.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde das ZNS-Homogenat mit kompletten Freund-Adjuvans (KFA), bestehend aus Paraffinöl und dem *Mycobacterium tuberculosis*, zu einer Emulsion verarbeitet um die Immunreaktion bei den Versuchstieren zu steigern. Dadurch konnten die bisher 50-80 benötigten Injektionen, welche Rivers in seiner Studie zur Auslösung einer EAE anfangs benötigte, bei zukünftigen Studien deutlich reduziert werden (Baxter, 2007; Jules Freund & McDermott, 1942; Rivers, Sprunt, & Berry, 1933).

In den Folgejahren wurde das EAE-Modell in zahlreichen Tierarten wie Meerschweinchen (J. Freund, Stern, & Pisani, 1947), Hasen (Morrison, 1947), Ratten (Lipton & Freund, 1952), Hamstern (Tal, Laufer, & Behar, 1958), Hunden (Thomas, Paterson, & Smithwick, 1950), Schafen (Innes, 1951) und auch Mäusen (Olitsky & Yager, 1949) untersucht. Sowohl der Krankheitsverlauf als auch die histopathologischen Veränderungen waren dabei sehr stark

von der jeweiligen Tierspezies abhängig (Baxter, 2007). Es zeigte sich im Laufe der Zeit immer deutlicher, dass durch das EAE-Modell klinische Symptome, aber auch neuro- und immunpathologische Prozesse der MS reproduzierbar untersucht werden konnten (Hohlfeld & Wekerle, 2001). Heutzutage wird das EAE-Modell vorwiegend bei Nagetieren wie Ratten, Meerschweinchen oder Mäusen angewendet (Gold, Linington, & Lassmann, 2006).

Die EAE wird entweder aktiv mit Hilfe einer subkutanen KFA-Immunisierung mit Myelin-Proteinen (MOG, PLP, MBP) oder passiv durch den Transfer von autoreaktiven, myelinspezifischen T-Zellen in naive Versuchstiere induziert, auch adoptive transfer-EAE (AT-EAE) genannt (McCarthy, Richards, & Miller, 2012).

Grundsätzlich führt eine EAE-Immunisierung zur Aktivierung von antigen-spezifischen T-Zellen der sekundären lymphatischen Organe. Diese bewirken eine Proliferation autoreaktiver T-Zellen (Th1- und Th17-Zellen), welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden und zu inflammatorischen Läsionen im Bereich des Rückenmarks, des Cerebellums und des Nervus opticus führen.

Die durch eine EAE-Immunisierung ausgelösten Symptome sind abhängig vom Tierstamm, dem für die Immunisierung verwendeten Antigen und der Art der EAE-Immunisierung.

Abhängig davon, welche Kombination man für seinen Versuchsaufbau wählt, äußern sich die klinischen Symptome der Versuchstiere monophasisch (Waxman, Fritz, & Hinrichs, 1980), schubförmig-remittierend (Hofstetter, Shive, & Forsthuber, 2002) oder chronisch (Mendel, Kerlero de Rosbo, & Ben-Nun, 1995).

Immunisiert man beispielsweise C57BL/6 Mäuse aktiv mit dem Protein MOG₃₅₋₅₅, kommt es zur Ausbildung eines monozyklischen chronischen Krankheitsverlaufes, wohingegen SJL Mäuse nach einer aktiven EAE-Immunisierung mit dem Protein PLP₁₃₉₋₁₅₁ eine schubförmig-remittierende Form der Erkrankung entwickeln (M. Kipp et al., 2017; McCarthy et al., 2012).

Insgesamt ist das EAE-Modell eines der wichtigsten experimentellen Tiermodelle um grundlegende pathophysiologische Fragestellungen neuroinflammatorischer Erkrankungen, wie der MS, zu untersuchen. Um jedoch die heterogene Pathogenese der MS umfassend darstellen zu können, bedarf es einer Vielzahl unterschiedlicher EAE-Modelle mit verschiedensten Kombinationen bezogen auf die Tierspezies, die Induktionstechnik und die verwendeten Antigene. Jede Kombination kann nur einen gewissen Teilaspekt der heterogenen und komplexen MS-Pathologie abbilden (Kuerten & Angelov, 2008).

1.2.3 Das Cup-EAE-Modell

Neuropathologisch ist die MS durch fokale, demyelinisierte Läsionen im gesamten ZNS charakterisiert, welche von Oligodendrozytenapoptose, Gliose, axonalem Schaden und der Migration von Immunzellen in das ZNS begleitet werden. Die zugrundeliegende Pathophysiologie konnte bis heute nicht eindeutig erforscht werden. Einige Studien gehen von der sogenannten „outside-in“-Theorie aus, nach der es zunächst zur Auslösung einer Autoimmunreaktion kommt, wodurch Immunzellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden und im Parenchym des Gehirns zu Demyelinisierungen und aktiven MS-Läsionen führen (Lucchinetti et al., 2000; Maggi et al., 2014). Andere Studien unterstützen jedoch die sogenannte „inside-out“-Theorie, nach der es zunächst zu einem neurodegenerativen Prozess kommt, welcher die Rekrutierung von Immunzellen in das Parenchym des Gehirns zur Folge hat (siehe Abbildung 3) (Barnett & Prineas, 2004; Baxi et al., 2015; Stys, Zamponi, van Minnen, & Geurts, 2012).

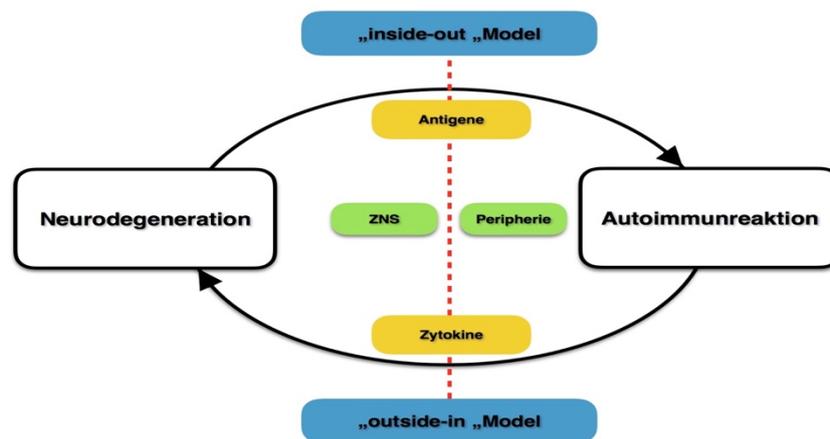


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Theorien zur Entstehung der Multiplen Sklerose.

Da die bereits zuvor beschriebenen Tiermodelle entweder auf der Basis einer aktiven Immunisierung (EAE-Modell) oder einer nicht immunvermittelten, toxisch ausgelösten Demyelinisierung (Cuprizin-Modell) beruhen, kann man hier nur jeweils eine der beiden Hypothesen untersuchen. Auf Grundlage dieser Problematik entwickelte unsere Arbeitsgruppe das sogenannte Cup-EAE-Modell, welches die toxisch induzierte Demyelinisierung (Cuprizin-Modell) mit einer aktiven EAE-Immunisierung (EAE-Modell) kombiniert, und somit die Vergleichbarkeit der experimentellen Bedingungen zu „realen“ pathologischen Prozessen der MS verbessert. Hierbei werden die Versuchstiere in einem ersten Schritt einer Cuprizin-Intoxikation ausgesetzt. Dadurch entwickeln sich im Bereich des Hippocampus, des Kortex und des *Corpus callosums* demyelinisierte Läsionen, welche von Oligodendrozytenapoptose, Mikrogliaaktivierung, Astroglie und axonalem Schaden begleitet werden (M. Kipp et al., 2009). Die anschließende aktive EAE-Immunisierung mit einem Fragment des Myelin-

Oligodendrozyten-Glykoproteins (MOG₃₅₋₅₅-Peptid) führt zu einer Autoimmunreaktion, welche inflammatorische Läsionen im Rückenmark und Cerebellum zur Folge hat. Studien unserer Arbeitsgruppe mit Cup-EAE behandelten Tieren konnten zeigen, dass eine vorausgehende neurodegenerative Schädigung die anschließende Rekrutierung von peripheren Immunzellen in das Parenchym des Gehirns verstärkt und somit eine Abhängigkeit zwischen neurodegenerativen Prozessen und der Stärke der Immunreaktion besteht (Scheld et al., 2016).

1.2.4 Das LPC-Modell

Neben dem Cuprizon-Modell gehört auch das LPC-Modell zu den toxischen Tiermodellen der MS-Forschung und dient zur Untersuchung von De- und Remyelinisierungsprozessen des ZNS.

Hierbei wird den Versuchstieren durch eine stereotaktische Injektion das Membrandetergens LPC, das zu einer akuten Demyelinisierung in der betroffenen Region führt, verabreicht. (Hall, 1972; Hall & Gregson, 1971).

LPC, auch Lysolecithin genannt, wird mit Hilfe der Phospholipase A₂ aus aktiviertem Cholin (CDP-Cholin) und Diacylglycerol gebildet. Es handelt sich um ein amphiphiles Lipid mit einer Kohlenwasserstoffkette (siehe Abbildung 4). Aufgrund des chemischen Aufbaus lagert sich LPC in die Phospholipiddoppelschicht von biologischen Membranen ein, bildet dort Mizellen und führt letztendlich zu

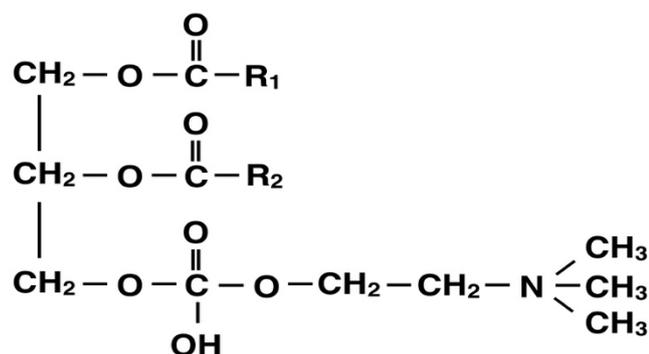


Abbildung 4: Strukturformel von Lysophosphatidylcholin (Lysolecithin).

deren Destabilisierung und Zerstörung (Christen, Jaussi, & Benoit, 2016; Gregson, 1989).

Erste *in vitro* Studien zeigten, dass LPC zu einer kompletten Auflösung von Myelin führen kann (Gent, Gregson, Gammack, & Raper, 1964).

Aufgrund der hohen Affinität von LPC zum MBP reagieren Oligodendrozyten und somit die myelinisierten Axone (sowohl des peripheren Nervensystems als auch des ZNS) besonders sensibel auf eine erhöhte LPC-Exposition (Hall, 1972; Hall & Gregson, 1971; Smith, 1982; Woodruff & Franklin, 1999). Neben einer akuten Demyelinisierung kommt es 6-12 Stunden nach der LPC-Injektion zu begleitenden Immunreaktionen wie einer Mikrogliaaktivierung, einer Migration von Makrophagen und zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn Schranke in den betroffenen Regionen (Ousman & David, 2000).

Die Entzündungsreaktion bewirkt zusätzlich eine erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (CD106) und ICAM1 (CD54) durch Endothelzellen läsionsnaher Blutgefäße. Diese führen zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und begünstigen dadurch die Einwanderung von Immunzellen in das ZNS (Hoflich et al., 2016; Ousman & David, 2000; Vereyken, Fluitsma, Bolijn, Dijkstra, & Teunissen, 2009).

Eine Woche nach der LPC-Injektion kommt es zur Remyelinisierung in den demyelinisierten Bereichen. Bei diesem Prozess können sowohl Oligodendrozyten als auch Schwann'sche Zellen beteiligt sein. Eine vollständige Remyelinisierung ist nach 5-6 Wochen erreicht (Blakemore, Eames, Smith, & McDonald, 1977; Jeffery & Blakemore, 1995; Vereyken et al., 2009; Woodruff & Franklin, 1999).

Mit Hilfe des LPC-Modells können somit in kürzester Zeit sowohl De- als auch Remyelinisierungsprozesse im ZNS reproduzierbar dargestellt und begleitende immunpathologische Prozesse analysiert werden.

1.3 Der Hyaluronsäurerezeptor - CD44

Das transmembrane Glykoprotein CD44 (cluster of differentiation 44) ist ein multifunktionelles und multistrukturelles Adhäsionsmolekül, das an wesentlichen Zell-Zell bzw. Zell-Matrixinteraktionen im gesamten menschlichen Körper beteiligt ist. Das Protein wird auch als extrazellulärer Matrixrezeptor III – (ECMRIII) (Carter & Wayner, 1988), Hyaluron-Rezeptor-1 (Hutch-1) (Gallatin et al., 1989), Homing-Cell-Adhesion-Molecule (HCAM) (Goldstein et al., 1989), phagozytotisches Glykoprotein 1 (Pgp-1) (Hughes, Colombatti, & August, 1983) oder Hermes-Antigen (S. Jalkanen & Jalkanen, 1992) bezeichnet. Zahlreiche intra- und extrazelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Beweglichkeit und Vermehrung von Zellen werden durch dieses Molekül reguliert (Naor, Sionov, & Ish-Shalom, 1997; Ponta, Sherman, & Herrlich, 2003).

CD44 konnte erstmals 1980 mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers F10-89-4 auf Lymphozyten, Monozyten, Thymozyten und Granulozyten nachgewiesen werden (Dalchau, Kirkley, & Fabre, 1980). Durch nachfolgende Studien wurden weitere Varianten von CD44 mit einem Molekulargewicht zwischen 80 und 200 kDa identifiziert, die ubiquitär auf nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert werden (Ponta et al., 2003). Alle identifizierten CD44-Varianten sind durch ein einziges konserviertes Gen codiert, das bei Mäusen auf dem Chromosom 2 (Colombatti, Hughes, Taylor, & August, 1982) und beim Menschen auf dem Chromosom 11p13 (Thorne, Legg, & Isacke, 2004) lokalisiert ist. Die mRNA des humanen CD44-Gens besteht insgesamt aus 20 Exons (Thorne et al., 2004).

Die am häufigsten vorkommende Variante des CD44-Proteins wird als Standard CD44-Protein (CD44s) bezeichnet, und wird durch die konstanten Exons 1-5, 16-18 und 20 des Gens codiert.

Wie in Abbildung 5 dargestellt, besteht das CD44s aus einer konstanten extrazellulären N-terminalen Domäne, einer Stammregion, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer C-terminalen zytoplasmatischen Domäne (Dzwonek & Wilczynski, 2015; Sneath & Mangham, 1998). Die N-terminale Domäne ist in der Lage, zahlreiche Liganden wie Hyaluronsäure (HS), extrazelluläre Matrixglykoproteine (EZM), Wachstumsfaktoren (WF), Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Zytokine (Zy) zu binden, welche intrazellulär an der C-terminalen Domäne des Proteins, zu einer ligandengesteuerten Signaltransduktion führen. Die transmembrane Domäne verankert und stabilisiert das Protein in der Plasmamembran der jeweiligen Zelle und ist an der Signaltransduktion beteiligt (Dzwonek & Wilczynski, 2015).

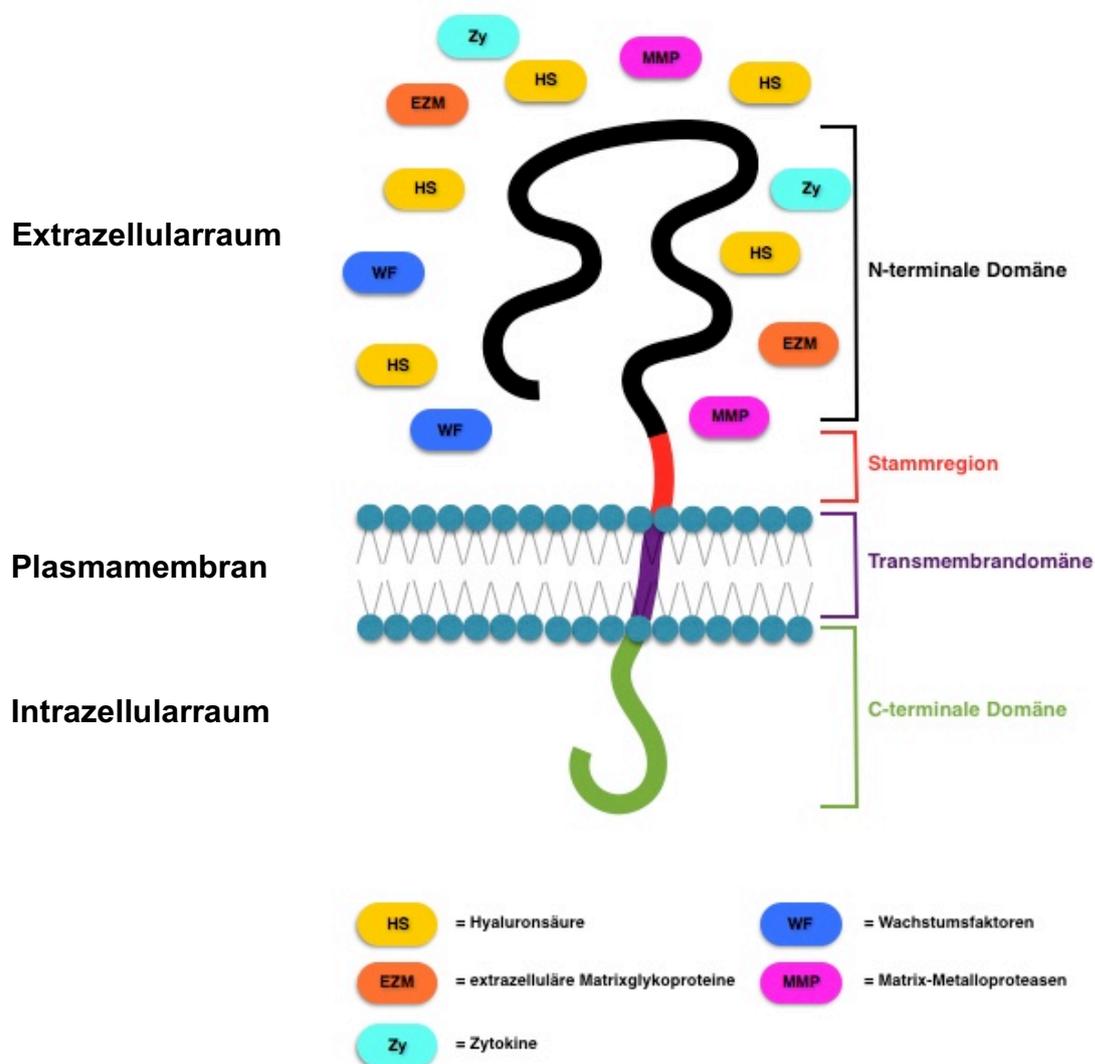


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des CD44s-Proteins.

Die Varianz zwischen den verschiedenen CD44-Molekülen beruht vorwiegend auf posttranslationalen Modifikationen wie dem alternativen Spleißen und ist stark von der Lokalisation der Zelle und dem Zelltyp abhängig (Ponta et al., 2003). Hierbei werden die variablen Exons 6-15 (auch v1-v10 genannt) durch alternatives Spleißen reguliert und unterschiedlich exprimiert (siehe Abbildung 6).

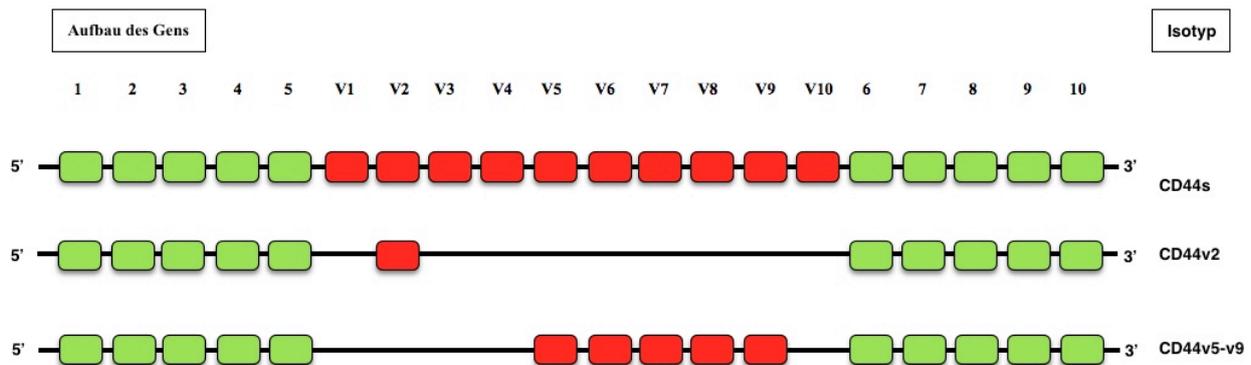


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung des menschlichen CD44-Gens und mögliche Isotyp-Varianten.

Die dadurch entstehenden CD44-Isotyp-Varianten (CD44v) werden vorwiegend in epithelialen Zellen und bei pathologischen Prozessen verstärkt exprimiert (Thorne et al., 2004), konnten aber auch in humanem Hirngewebe (Kaaijk, Pals, Morsink, Bosch, & Troost, 1997) oder primären Hirntumoren (Kaaijk et al., 1995) nachgewiesen werden.

Im ZNS wird CD44 in der weißen Substanz durch Gliazellen, vorwiegend Astrozyten und Oligodendrozyten, exprimiert und dient sowohl bei Mäusen als auch in humanem Gewebe als Marker für astrozytäre Vorläuferzellen (Liu et al., 2004; McKenzie, Dalchau, & Fabre, 1982; Moretto, Xu, & Kim, 1993; Naruse, Shibasaki, Yokoyama, Kurachi, & Ishizaki, 2013).

CD44 spielt nicht nur unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle, sondern auch bei pathologischen Vorgängen. Bei zahlreichen Tumorerkrankungen wie Brustkrebs (de la Torre, Heldin, & Bergh, 1995; Kaufmann et al., 1995), Darmkrebs (Wielenga et al., 1993) oder Hautkrebs (Simon et al., 1996) wird CD44 bzw. seine Isotyp-Varianten wie CD44v6 als Tumormarker und prognostisches Hilfsmittel eingesetzt. Bei dem Marker-Protein CD44v6 lässt sich beispielsweise eine negative Korrelation zwischen einer erhöhten Expression und der Überlebensrate von Brustkrebspatienten feststellen (Kaufmann et al., 1995). CD44 ist nicht ausschlaggebend für die Bildung oder das Wachstum von Tumoren, hat aber wesentliche Auswirkungen auf deren Metastasierungsprozess (Weber et al., 2002).

Eine erhöhte Expression von CD44 wirkt sich auch auf Entzündungsprozesse aus und spielt bei Autoimmunerkrankungen wie der Colitis ulcerosa oder der rheumatoiden Arthritis eine Rolle (Ghazi-Visser et al., 2013; Mikecz, Dennis, Shi, & Kim, 1999). Aufbauend auf diesen

Erkenntnissen liegt die Vermutung nahe, dass CD44 auch bei neuroinflammatorischen Erkrankungen, wie der MS, eine wichtige Rolle spielt.

Bei MS-Patienten konnte vergleichend zu gesunden Menschen sowohl eine erhöhte Konzentration an HS als auch eine erhöhte Expression von CD44 in der weißen Substanz, vorwiegend in läsionsnahen Regionen, nachgewiesen werden (Back et al., 2005; Girgrah et al., 1991). Mit Hilfe des Astrozytenmarkers GFAP konnte eine Kolokalisation von CD44 mit reaktiven / aktivierten Astrozyten gezeigt werden (Girgrah et al., 1991).

Passend zu diesen Erkenntnissen konnte im EAE-Modell eine erhöhte Expression von CD44, sowohl in akut- als auch in chronisch demyelinisierten Läsionen, nachgewiesen werden (Back et al., 2005).

Welche Rolle CD44 bei neuroinflammatorischen Prozessen genau spielt, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden, jedoch beschäftigten sich schon einige Studien mit dieser Thematik (siehe Tabelle 1).

Autor	Journal	Jahr	Ergebnisse
Girgrah et al.	Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	1991	Erhöhte Expression von CD44 in der weißen Substanz des ZNS von MS-Patienten
Moretto et al.	Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	1993	CD44 wird in vitro durch menschliche Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert
Haegel, Tolg, Hofmann & Ceredig	The Journal of Cell Biology	1993	Aktivierte Astrozyten und T-Zellen exprimieren die gleiche CD44-Variante; CD44 ist an adhäsiven Wechselwirkungen zwischen Astrozyten und T-Zellen beteiligt
Brennan et al.	Immunology	1999	CD44 ist bei der EAE an der Migration von Leukozyten in das ZNS beteiligt
Soilu-Hanninen, Laaksonen & Hanninen	Journal of Neuroimmunology	2005	CD44 wird von T-Zellen während eines MS-Schubes erhöht exprimiert
Rampon et al.	Stem Cells	2008	CD44 spielt eine zentrale Rolle bei der trans-epithelialen Migration von neuronalen Vorläuferzellen in das ZNS

Johnson & Ruffel	Journal of Inflammation & Allergy – Drug Targets	2009	CD44 spielt eine entscheidende Rolle bei der Leukozytenrekrutierung, aber auch bei der Begrenzung von entzündlichen Reaktionen
Winkler et al.	The Journal of Biological Chemistry	2012	Eine Bindung von Hyaluronsäure an CD44 fördert bei der EAE die Migration von Lymphozyten in das ZNS
Flynn, Michaud & Madri	The American Journal of Pathology	2013	CD44 Knockout-Mäuse zeigen schwerere klinische Symptome bei der EAE, eine erhöhte Anzahl an eingewanderten Immunzellen in das ZNS und eine erhöhte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, verglichen mit Mäusen des Wildtyps
Ghazi-Visser et al.	The FASEB Journal	2013	Die genetische Ablation der CD44-Isoformen CD44 (v7) und CD44 (v10) haben die klinischen Symptome der EAE sowie die Anzahl der entzündlichen Infiltrate signifikant reduziert
Piao, Wang & Duncan	Glia	2013	CD44 spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von transplantierten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in inflammatorische, demyelinisierte Läsionen im Rückenmark
Krauspe et al.	Journal of Molecular Neuroscience	2015	CD44 wird bei einer Toxin-induzierten Demyelinisierung auf genetischer Ebene erhöht exprimiert

Tabelle 1: Auflistung verschiedener Arbeiten, die sich mit CD44 im Kontext der Multiplen Sklerose beschäftigt haben.

1.4 Fragestellung

Obwohl die MS die häufigste neurologische Erkrankung unter jungen Erwachsenen in der westlichen Welt ist, konnten die Krankheitsursachen und ihre Entstehung bis heute nicht ausreichend geklärt werden (Keegan & Noseworthy, 2002; Lassmann et al., 2001).

Um das heterogene Krankheitsbild und die pathophysiologischen Zusammenhänge der MS besser verstehen zu können, bedient man sich in der MS-Forschung unterschiedlicher experimenteller Tiermodelle, welche jeweils in der Lage sind einen bestimmten Teilaspekt der Erkrankung abzubilden. Die toxischen Tiermodelle (Cuprizon-Modell und LPC-Modell) erlauben die nähere Betrachtung neurodegenerativer, nicht autoimmunvermittelter Aspekte der MS, wohingegen das EAE-Modell und das kombinatorische Cup-EAE-Modell Rückschlüsse auf autoimmunvermittelte, inflammatorische Prozesse zulassen.

Das Oberflächenprotein CD44 wird ubiquitär in nahezu allen Körperzellen aber auch in der weißen Substanz des ZNS durch Gliazellen, vorwiegend Astrozyten und Oligodendrozyten, exprimiert (Dalchau et al., 1980; Liu et al., 2004; McKenzie et al., 1982; Moretto et al., 1993; Naruse et al., 2013; Ponta et al., 2003). Obwohl CD44 in der Literatur auch im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen, wie der Tumorgenese oder entzündlichen Vorgängen genannt wird, ist die genaue Funktion bei neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen, wie der MS, noch nicht ausreichend geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von CD44 im Rahmen der MS-Pathologie besser verstehen zu können. Bereits veröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten mit Hilfe einer Gene-Array Analyse zeigen, dass CD44 bei einer Cuprizon-induzierten Demyelinisierung erhöht exprimiert wird (Krauspe et al., 2015).

Im Rahmen der vorgelegten Dissertationsarbeit untersuchte ich die Expression von CD44s in verschiedenen Multiple Sklerose Tiermodellen. Wir verwendeten sowohl toxische als auch inflammatorische Tiermodelle. Ich versuchte einerseits, die Intensität der CD44-Färbung mit dem Ausmaß der Demyelinisierung und der begleitenden reaktiven Gliose zu korrelieren. Andererseits war es mein Ziel anhand des anti-CD44 Färbemusters Rückschlüsse auf die CD44 exprimierenden Zellen ziehen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich	15307
Cuprizon (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon)	Sigma-Aldrich	C9012
3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Chromogen	Dako	K3468
3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Substrat	Dako	K3468
Dinatriumhydrogenphosphat (wasserfrei)	Merck Millipore	106559
DPX mouting media	VWR Prolabo	360292F
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth	8043.2
Elite ABC-Kit	Vectastain	PK-6100
Ethanol 100%	Merck Millipore	100983
Formaldehyd 37%	Roth	P733.2
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich	H3136
Aluminiumkaliumsulfat- Dodecahydrat	Merck Millipore	101042
Natriumiodat	Merck Millipore	106525
Natriumdihydrogenphosphat - Monohydrat	Merck Millipore	106346
Natronlauge	Merck Millipore	109137
Normales Ziegenserum	Vector	S-1000
Paraffin	Leica Biosystems Paraplast	39602012
PBS Dulbecco-Pulver ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom	L-182-50

Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
Salzsäure	Roth/Merck	K025.1/1.09057
Tris (PUFFERAN®)	Roth	4855.2
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Roth	8070.4
Xylol	VWR Chemicals	1330-20-7
Zitronensäure	Roth	X863.2
Zitronensäure Monohydrat	Merck Millipore	100244

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien bei der immunhistochemischen Färbung.

2.2 Puffer, Blockseren und Färbelösungen

- 1. PBS-Puffer:** 47,75 g PBS-Pulver ohne Ca²⁺ / Mg²⁺ (Biochrom-L 182-50)
(1x Fertiglösung) 5 l destilliertes Wasser
pH-Wert auf 7.4 eingestellt
- 2. Citratpuffer:** 10,5 g Zitronensäure (ROTH X863.2)
5 l destilliertes Wasser
pH-Wert auf 6.0 eingestellt
- 3. Tris-EDTA-Puffer:** 6,05 g Tris (PUFFERAN®; ROTH 4855.2)
1,85 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (ROTH 8043.2)
5 l destilliertes Wasser
pH-Wert auf 9.0 eingestellt
- 4. Blockserum:** Verdünnung 1:20
2,5 ml normales Ziegenserum (VECTOR S-1000)
47,5 ml PBS

- 5. 0,3% H₂O₂:** Verdünnung 1:100
 1 ml H₂O₂ (30% vol/vol; Roth 8070.4)
 99 ml PBS
- 6. DAB-Komplex:** Verdünnung 1:50
 20 µl DAB-Stock
 980 µl DAB-Substrat
- 7. Perfusionslösung/** 100 ml Formaldehyd (37%)
Fixierlösung: 900 ml destilliertes Wasser
 4,6 g Natriumdihydrogenphosphat (wässrig)
 8,0 g Dinatriumhydrogenphosphat
- 8. Hämatoxylin-** 1 g Hämatoxylin
Lösung 1000 ml destilliertes Wasser
 200 mg Natriumiodat
 50 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat
 50 g Chloralhydrat
 1 g Zitronensäure Monohydrat

2.3 Versuchstiere

Für diese Untersuchung wurden 10 Wochen alte, 19-21 g schwere Mäuse vom Stamm C57BL/6J (Janvier/Frankreich) verwendet. Die Tiere wurden nach standardisierten Laborbedingungen gemäß der Organisation „Federation of European Laboratory Animal Science Association's (felasa)“ in gut belüfteten Käfigen gehalten, welche regelmäßig gewechselt wurden. Die Versuchstiere wurden bei einem festgelegten Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden und einer standardisierten Raumtemperatur von 23 °C ± 2°C gehalten. Eine regelmäßige Luftzirkulation und eine standardisierte Luftfeuchtigkeit von 55% ± 10%, waren ebenfalls gewährleistet.

Bei allen Versuchstieren wurden die aktuell geltenden Tierschutzbestimmungen eingehalten und eine Genehmigung für die Durchführung der Tierversuche gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) lag durch die Regierung von Oberbayern vor (Tierversuchsgenehmigung 55.2-154-2532-73-15).

2.4 Versuchsaufbau

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Expression von CD44 in akut demyelinisierten Läsionen bei Mäusen immunhistochemisch zu untersuchen. Bereits 2015 konnte durch unsere Arbeitsgruppe mit Hilfe eines Gene-Arrays gezeigt werden, dass CD44 im Rahmen einer Toxin-induzierten Demyelinisierung (Cuprizon-Modell) erhöht exprimiert wird (Krauspe et al., 2015). Um diese Ergebnisse immunhistochemisch zu bestätigen wurden in dieser Studie neben dem Cuprizon-Modell noch 3 weitere murine MS Tiermodelle, die zur Erforschung neurodegenerativen Erkrankungen dienen, herangezogen (Abbildung 7). Neben der CD44-Expression wurde auch die Mikrogliaaktivität, der Demyelinisierungsgrad und deren Abhängigkeit voneinander untersucht.

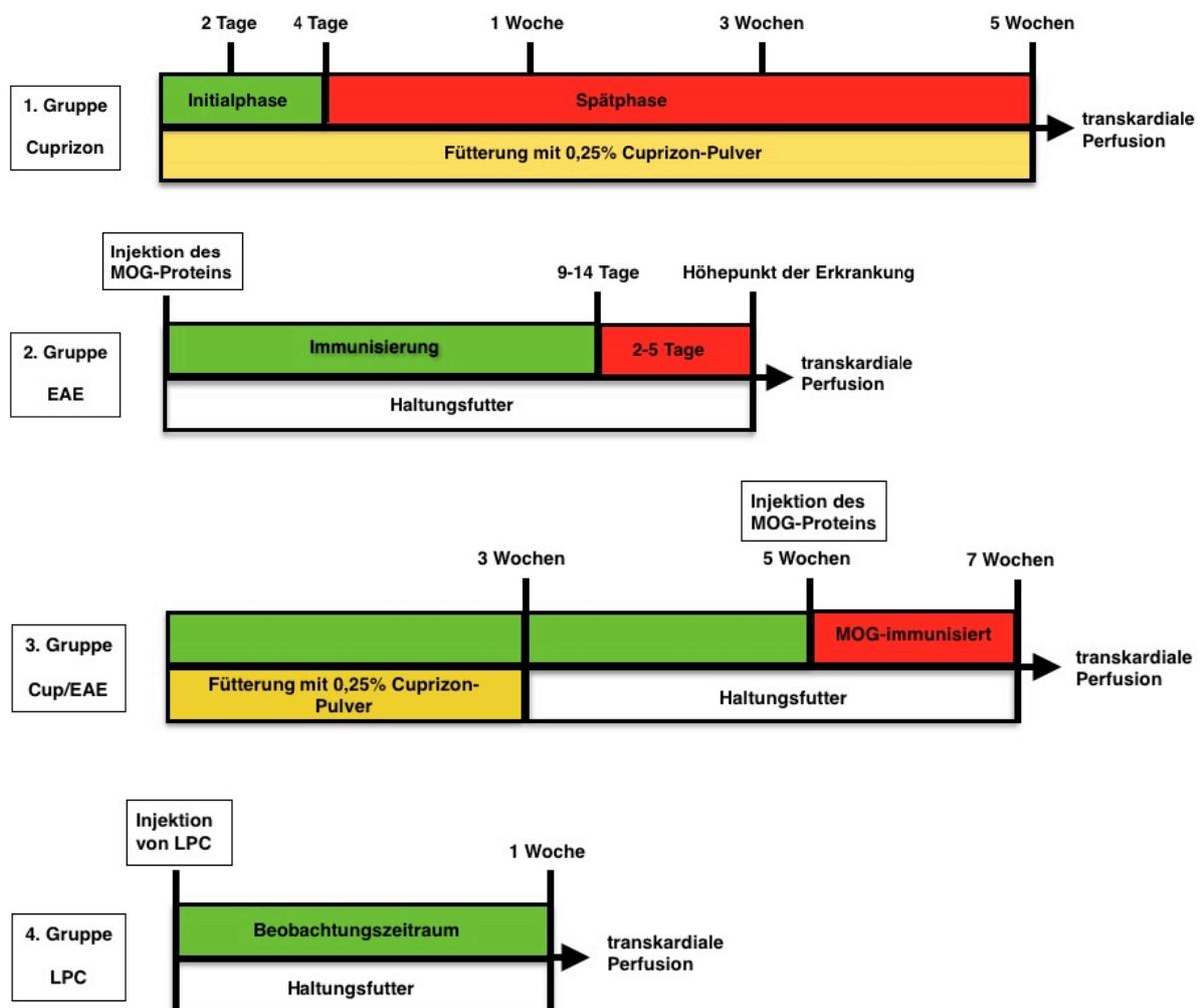


Abbildung 7: Schematische Darstellung der verschiedenen Versuchsgruppen.

2.5 Durchführung der Versuche und Materialgewinnung

Für Gruppe 1 und 3 wurde das mit Cuprizone versetzte Futter (0,25%) aus 200 g gemahlenem Standardfutter und 0,5 g Cuprizone hergestellt. Das Futter wurde alle 2 Tage frisch zubereitet und die Hälfte des vorgemischten Futters über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Versuchsgruppen 2 und 4 bekamen über den ganzen Versuchszeitraum normales Haltungsfutter in gleicher Menge.

Jeder Käfig war standardmäßig mit Einstreu, Mäusehäuschen, Nestlet, 100 g des jeweiligen Futters (verteilt auf 2 getrennte Petrischalen mit jeweils 50 g) und jeweils einer Trinkflasche ausgestattet. Die Tiere hatten jederzeit Zugang zu Futter und Trinkwasser.

Am Versuchsende, wurde den Tieren zur tiefen Narkose ein Ketamin-Xylazin-Gemisch intraperitoneal verabreicht. Direkt im Anschluss daran erfolgte die transkardiale Perfusion, bei der dem zuvor betäubten Versuchstier durch den linken Ventrikel 20 ml PBS und 100 ml Fixierlösung injiziert wurde.

Nach der Fixierung der Versuchstiere wurde die Haut im Bereich der Schädelkalotte entfernt, diese durch einen sagittalen Schnitt eröffnet und das Gehirn bzw. das Rückenmark vorsichtig entnommen.

Die entnommenen Proben wurden anschließend mit der gleichen Fixierlösung über Nacht bei 4 °C postfixiert und am folgenden Tag für 12 Stunden in Leitungswasser gewässert. In der folgenden Nacht wurden die Versuchsproben in 50% Ethanol inkubiert und anschließend manuell dehydriert und dann in Paraffinblöcke eingebettet (Tabelle 3).

Nach der Fixierung und Einbettung der Gewebeproben, wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Leica, SM 2000R) hergestellt. Jeweils 2 Schnitte wurden auf einem Objektträger direkt aus dem warmen Wasserbad aufgenommen und anschließend bei 37 °C über Nacht getrocknet.

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	70% Ethanol	40 min
2	70% Ethanol	40 min
3	96% Ethanol	40 min
4	96% Ethanol	40 min
5	96% Ethanol	40 min
6	100% Ethanol	40 min
7	100% Ethanol	60 min
8	100% Ethanol	60 min
9	Xylol	40 min
10	Xylol	40 min
11	Xylol	40 min
12	Paraffin	60 min
13	Paraffin	60 min
14	Paraffin	2 Tage

Tabelle 3: Manuelle Paraffineinbettung.

2.6 Färbungen

2.6.1 Immunhistochemische Färbungen

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Darstellung des Oberflächenproteins CD44 die immunhistochemische Färbung nach der ABC-Methode angewendet. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein indirektes Nachweisverfahren von Antigenen, welches auf dem nachfolgenden Prinzip beruht:

- Der Primärantikörper (monoklonal oder polyklonal) bindet an das gesuchte Antigen im Gewebe (Abbildung 8 A).
- Der Sekundärantikörper, welcher biotinyliert ist, bindet an den Primärantikörper und ist gegen diesen gerichtet (Abbildung 8 B).
- Durch die Affinität von Avidin zu Biotin bindet der Avidin-Biotin-Komplex an den biotinylierten Sekundärantikörper (Abbildung 8 C).
- Die im ABC-Komplex enthaltene Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert nach Zugabe des DAB-Komplexes (3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Chromogen und 3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Substrat) in Kombination mit H_2O_2 die Umwandlung eines phenolischen Substrates in dessen unlösliche Form. Diese Umwandlung ist durch einen bräunlichen Niederschlag erkennbar (Abbildung 8 D).

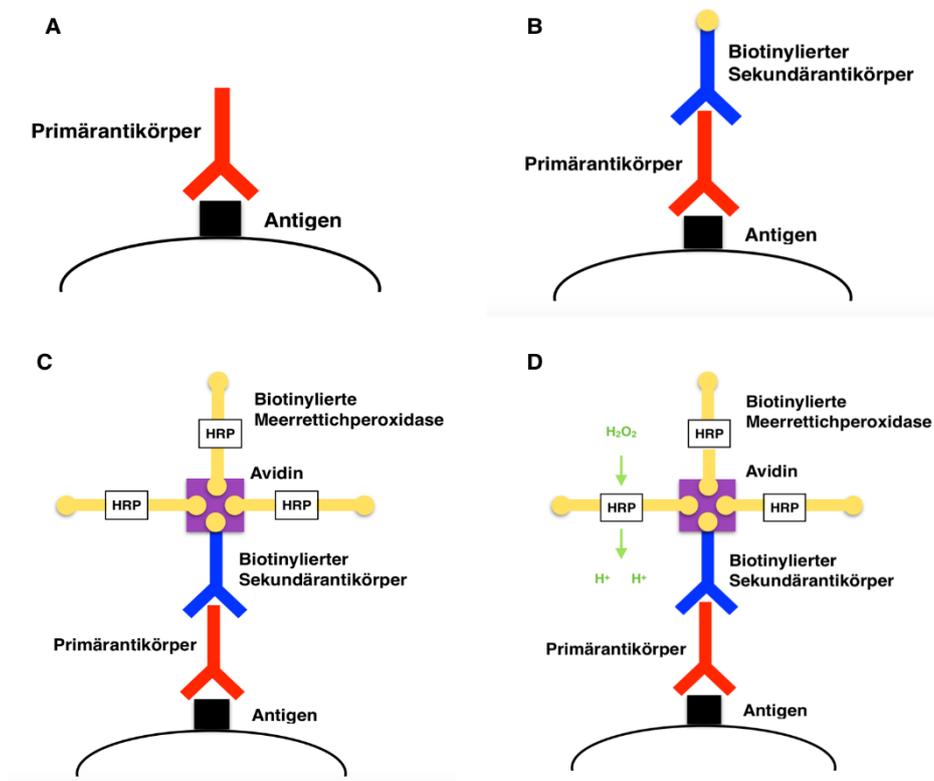


Abbildung 8: Schematische Darstellung der ABC-Methode.

2.6.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Die Färbungen der verschiedenen Objektträger erfolgten immer nach dem gleichen, einheitlich gültigen, Färbeprotokoll (siehe Tabelle 8). Durch diese Vorgehensweise sind standardisierte, qualitativ hochwertige und vor allem vergleichbare Färbequalitäten gewährleistet.

Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte 3-mal für 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und mit Hilfe der absteigenden Alkoholreihe, gemäß Tabelle 4, rehydriert.

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Xylol I	10 min
2	Xylol II	10 min
3	Xylol III	10 min
4	Xylol 50% / Ethanol 50%	5 min
5	100% Ethanol	3 min
6	100% Ethanol	3 min
7	96% Ethanol	3 min
8	96% Ethanol	3 min
9	70% Ethanol	3 min
10	50% Ethanol	3 min
11	destilliertes Wasser	3 min

Tabelle 4: Entparaffinierung durch Xylol und Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe.

Bei der Fixierung des Gewebes und der Einbettung in Paraffin kann es zur Bildung von „crosslinks“ kommen (Maskierung), welche das Ergebnis der immunhistochemische Färbung beeinträchtigen können. Um dies zu verhindern, wurden die Schnitte anschließend in Citratpuffer (pH 6,0) für 10 Minuten in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht (Demaskierung durch „heat induced epitope retrieval“; „HIER-Methode“).

Anschließend wurden die Schnitte für 15 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt und 3-mal für 5 Minuten unter leichtem Schütteln in PBS (Phosphatpufferlösung) gespült.

Die folgenden Schritte wurden alle in einer feuchten Kammer durchgeführt, um ein Austrocknen der Schnitte während der Inkubationszeiten zu verhindern.

Um einer unspezifischen Hintergrundfärbung vorzubeugen, erfolgte zunächst ein Blockierungsschritt mit 5% normalem Ziegen Serum (verdünnt in PBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden anschließend nur abgeklopft und der Primärantikörper appliziert (pro Schnitt 100 µl).

Der Primärantikörper wurde in 5% normalem Ziegen Serum verdünnt. Die entsprechenden Verdünnungen sind in Tabelle 5 angegeben.

Antikörper	Verdünnung	Firma	Bestellnummer	Demaskierung
Ratte-anti CD44 IgG	1:2000	Abcam	ab119863	Citrat
Hase-anti-iba1 IgG	1:5000	Wako	019-19741	Tris- EDTA
Maus-anti-PLP IgG	1:5000	Serotec	MCA- 839G	keine

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper.

Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Am 2. Tag wurden die Objektträger zwischen jedem der folgenden Schritte 3-mal für 5 Minuten unter leichtem Schütteln in PBS gespült.

Um die endogene Peroxidase zu inaktivieren, erfolgte eine Inkubation der Schnitte in 0,3%-igen H₂O₂ (hergestellt aus 30% H₂O₂ Stammlösung verdünnt mit PBS). Dieser Schritt fand unter leichtem Schütteln und im Dunkeln statt.

Im Anschluss wurde der biotinylierte Sekundärantikörper appliziert (pro Schnitt 100 µl) und die Schnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Sekundärantikörper wurde je nach Konzentration mit 5% normalem Ziegen Serum verdünnt (siehe Tabelle 6).

Antikörper	Verdünnung	Wirt	Firma	Bestellnummer
Anti-Ratte IgG (biotinyliert)	1:200	Ziege	VECTOR	BA 9400
Anti-Hase IgG (biotinyliert)	1:200	Ziege	VECTOR	BA 1000
Anti-Maus IgG (biotinyliert)	1:200	Ziege	VECTOR	BA 9200

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper.

Bevor der Avidin-Biotin-Komplex aufgetragen wurde, musste dieser 30 Minuten vor der Anwendung hergestellt und dunkel gelagert werden.

Nach den 30 Minuten wurden die Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Komplex bedeckt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (100 µl pro Schnitt).

Durch die darauffolgende Zugabe des DAB-Komplexes für 10 Minuten wurde die bräunliche Färbung der Schnitte erreicht.

Anschließend wurden die Objektträger unter leichtem Schütteln für 5 Minuten in Leitungswasser und 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült.

Abschließend wurden die Zellkerne der Gewebeschnitte mit Hilfe der Hämatoxylin-Färbung (H-Färbung) leicht gegengefärbt. Hierzu wurden die Schnitte 5 Minuten unter leichtem Schütteln in destilliertem Wasser gespült und anschließend für 15 Sekunden in das Hämalun-Bad getaucht. Danach wurden die Objektträger zum Bläuen für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser in einer Küvette gelagert.

Nach erneutem Spülen in destilliertem Wasser konnten die Schnitte abschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe (siehe Tabelle 7) dehydriert und mit DPX eingedeckt werden. Um ein optimales Ergebnis zu erhalten wurden die Objektträger nach dem eindecken mit Gewichten beschwert und über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Destilliertes Wasser	3 min
2	50% Ethanol	3 min
3	70% Ethanol	3 min
4	96% Ethanol	3 min
5	96% Ethanol	3 min
6	100% Ethanol	3 min
7	100% Ethanol	3 min
8	Xylol 50% / Ethanol 50%	5 min
9	Xylol III	10 min
10	Xylol II	10 min
11	Xylol I	10 min

Tabelle 7: Dehydrierung durch aufsteigende Alkoholreihe und Vorbereitung zum Eindecken mit Xylol.

Schritt	Ablauf
1	Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe gem. Tabelle 4
2	Demaskierung: Die Schnitte werden für 10 Minuten in der Mikrowelle in Citratpuffer (pH 6,0) zum Kochen gebracht
3	Abkühlung der Schnitte auf Raumtemperatur durch 15-minütiges Umspülen der Küvette mit Leitungswasser
4	3 x 5-minütiges Spülen in PBS unter leichtem Schütteln
5	Blockierungsschritt mit 5%-igem normalem Ziegenserum
6	Inkubation in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur
7	Schnitte leicht abtropfen lassen
8	Applikation des Primärantikörpers (Konzentration gem. Tabelle 5)
9	Inkubation in einer feuchten Kammer über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C
10	3 x 5 Minuten in PBS unter leichtem Schütteln spülen
11	Applikation des Peroxidase-Blocks (0,3%-iges H ₂ O ₂)
12	Inkubation für 30 Minuten unter leichtem Schütteln und in absoluter Dunkelheit
13	3 x 5 Minuten spülen in PBS unter leichtem Schütteln
14	Applikation des Sekundärantikörpers (Konzentration gem. Tabelle 6)
15	Inkubation in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur
16	3 x 5 Minuten spülen in PBS unter leichtem Schütteln
17	Applikation des Avidin-Biotin-Komplexes (muss 30 Minuten vorher vorbereitet worden sein und dunkel gelagert werden)
18	Inkubation in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur
19	3 x 5 Minuten spülen in PBS unter leichtem Schütteln
20	Applikation des DAB-Komplexes zur Visualisierung
21	Inkubation für 10 Minuten unter dem Abzug bei Raumtemperatur
22	5 Minuten in Leitungswasser spülen
23	5 Minuten in destilliertem Wasser spülen
24	Hämatoxylin-Gegenfärbung: Schnitte werden für 15 Sekunden im Hämalaun-Bad inkubiert
25	10 Minuten Bläuen unter fließendem Leitungswasser
26	Spülen in destilliertem Wasser unter leichtem Schütteln
27	Dehydrierung der Gewebeschnitte mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (gem. Tabelle 7)
28	Eindeckeln der Schnitte mit DPX
29	Schnitte werden über Nacht mit Gewichten beschwert und unter dem Abzug getrocknet

Tabelle 8: Färbeprotokoll der immunhistochemischen Färbungen.

2.7 Auswertung

2.7.1 Untersuchte Hirnregionen

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit untersuchten wir die Arbeitshypothese, dass CD44 im Rahmen einer Demyelinisierung erhöht exprimiert wird. Als experimentelle „Tools“ benutzten wir hierfür die zuvor beschriebenen Tiermodelle, die alle mehr oder weniger durch eine Demyelinisierung in bestimmten ZNS-Regionen charakterisiert sind. Da in den verschiedenen Tiermodellen unterschiedliche ZNS-Regionen betroffen sind, wurden vor einer histologischen Auswertung sogenannte „regions of interest“ (ROI) definiert. Diese sind für das Cuprizone-Modell in Abbildung 9 dargestellt:

- mediales Corpus callosum = mCC
- laterales Corpus callosum = LCC
- Fornix hippocampi = Fx
- primär somatomotorischer Kortex = pMcx
- primär somatosensorischer Kortex = pScx
- Capsula interna = CI

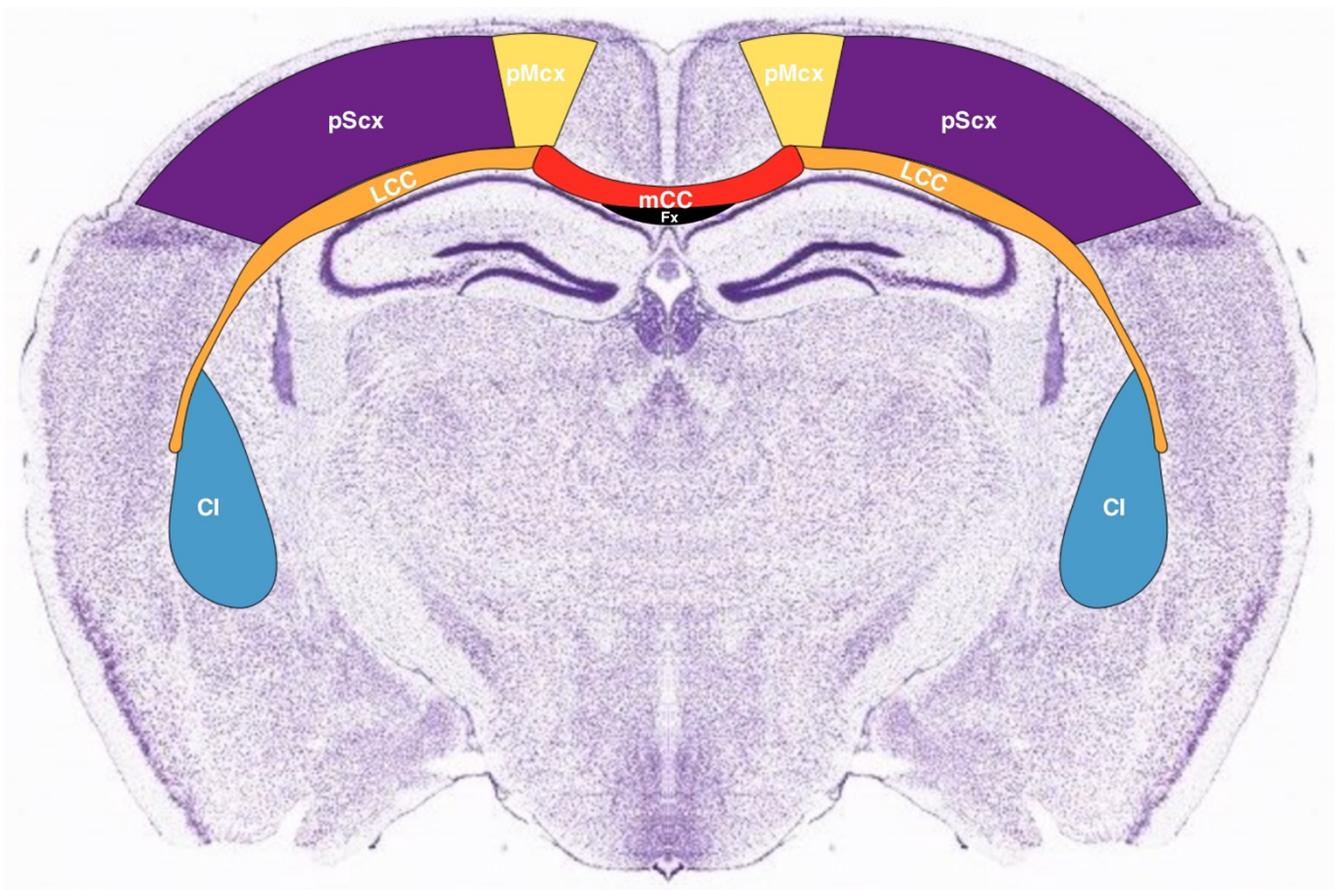


Abbildung 9: Darstellung der in der Studie analysierten Gehirnregionen im Cuprizone-Modell.

Im LPC-Modell wurde das LPC in das paramediane *Corpus callosum* appliziert. Die Läsion ist dann im Bereich des lateralen und bei entsprechender Läsionsausbreitung, auch im Bereich des medialen *Corpus callosum* zu finden.

Im EAE-Modell finden sich inflammatorisch-demyelinisierte Herde vor allem im Bereich des Rückenmarks. Das Cerebrum ist im Gegensatz zum Cuprizone-Modell weitestgehend nicht betroffen.

Im dem von unserer Arbeitsgruppe entwickelten kombinatorischen Cup-EAE-Modell (Scheld et al., 2016) zeigen sich inflammatorisch-demyelinisierte Herde vor allem in Form von perivaskulären Infiltraten. Diese sind prinzipiell im gesamten ZNS zu finden, hier fokussierten wir uns jedoch auf solche des Cerebrums.

2.7.2 Beurteilung der CD44-Expression

Um das Expressionsniveau von CD44 beurteilen zu können, wurden nach der immunhistochemischen Aufbereitung der Gewebeschnitte histologische Bilder angefertigt. Diese mikroskopischen Bilder wurden alle unter den gleichen Bedingungen aufgenommen (Mikroskop: Nikon Eclipse E200; Kamera: Nikon DS-2M-L2; Belichtungszeit: 1/1000 Sekunden) um eine bestmögliche Vergleichbarkeit sicherzustellen. Im Anschluss wurden die Aufnahmen mit Hilfe einer densitometrischen Messung ausgewertet. Diese erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ (Version 1.50i für Windows, National Institute of Health, USA).

In einem ersten Schritt werden die zuvor angefertigten mikroskopischen Bilder in das Programm ImageJ importiert und in „8-bit-grayscale“ (8-bit-Graustufen) Bilder umgewandelt. Anschließend wird die individuelle ROI in jeder einzelnen mikroskopischen Aufnahme manuell umrandet und abgespeichert (exemplarisch dargestellt in Abbildung 10 **A**).

Damit die Auswertung der einzelnen Bilder vergleichbar ist wird ein einheitlicher Schwellenwert für die densitometrische Messung festgelegt, der sogenannte „Threshold“. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Aufnahmen mit dem „Auto Threshold – Yen, des Programms ImageJ ausgewertet.

In einem nächsten Schritt erfolgte die densitometrische Messung unter den zuvor festgelegten Parametern wodurch der prozentuale Anteil der CD44-positiven Regionen im Bereich der RIO bestimmt wurde. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurden die Daten der einzelnen Versuchsgruppen in das Programm GraphPad Prism (Version 7.0c für Mac, GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) übertragen und statistisch ausgewertet (exemplarisch dargestellt in Abbildung 10 **B**).

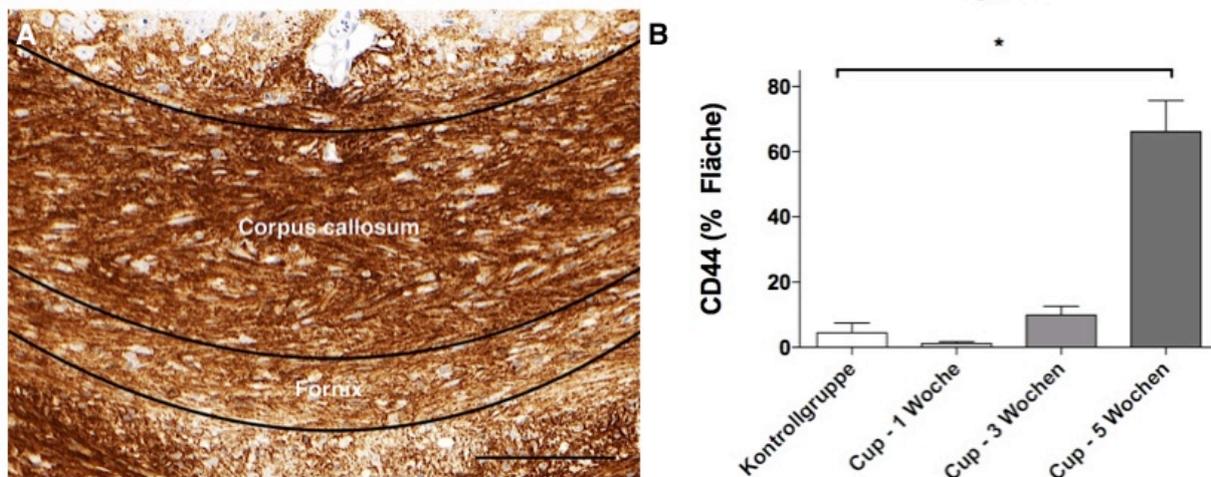


Abbildung 10: (A) Darstellung der individuell festgelegten ROI. (B) Grafische Darstellung der Ergebnisse der densitometrischen Messung (* $p < 0,05$).

Maßstab: 100µm (A)

2.7.3 Statistische Auswertung

Nachdem von den immunhistochemisch aufbereiteten Gewebeproben histologische Bilder angefertigt und die ROI bei jedem Bild individuell festgelegt worden ist, konnten die durch die densitometrische Messung gewonnenen Daten statistisch ausgewertet werden.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 7.0c für Mac, GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

Die Unterschiede zwischen den ausgewerteten Gruppen wurden mit einem Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von einem Dunn's Post-Hoc-Test für nicht-parametrische Daten auf Signifikanz geprüft. Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM= Standard Error of the Mean) angegeben. Die Signifikanzen, die sich in Bezug auf die Kontrollgruppe ergaben, sind durch Sternchen gekennzeichnet (* $p < 0,05$).

3. Ergebnisse

3.1 Erhöhte CD44-Expression bei fortlaufend toxisch induzierter Demyelinisierung ohne T-Zell Beteiligung

Das Cuprizone-Modell ist ein wichtiges Tiermodell zur Erforschung neurodegenerativer, nicht-autoimmunvermittelter Aspekte der MS.

In der vorliegenden Arbeit wurde das *Corpus callosum* als „region of interest“ in Bezug auf die durch Fütterung mit Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon) ausgelöste Demyelinisierung beurteilt. In dieser Hirnregion lassen sich die Folgen einer toxisch induzierten Demyelinisierung und ihre Begleitreaktionen wie die Astrozyten- und Mikrogliaaktivierung als auch der bei fortgeschrittener Demyelinisierung auftretende axonale Schaden reproduzierbar untersuchen (Goldberg, Clarner, Beyer, & Kipp, 2015).

Zunächst wurde untersucht, ob durch die Behandlung von Tieren mit 0,25% Cuprizone, sowohl nach 2-4-tägiger Fütterung (Initialphase) als auch nach 1-5-wöchiger Fütterung (Spätphase) eine erhöhte CD44-Expression im *Corpus callosum* zu beobachten ist.

Hierzu wurden sowohl Tiere der Initialphase als auch Tiere der Spätphase gegenüber der Kontrollgruppe verglichen und ausgewertet.

Um neben der CD44-Expression auch die begleitende Mikrogliose und den Myelinisierungsgrad beurteilen zu können, wurden neben immunhistochemischen anti-CD44 auch anti-Iba1 und anti-PLP Färbungen angefertigt und ausgewertet.

In Gehirnen von Tieren der Kontrollgruppe war lediglich eine sehr geringe anti-CD44-Immunreaktivität sichtbar. Diese war vorwiegend im Bereich des *medialen Corpus callosums*, des *Fornix* und dem Ansatz der *Fissura longitudinalis cerebri* als diffuse immunhistochemische bräunliche Färbung lokalisiert (Abbildung 11 **C**, 12 **A**). Einige angefärbte Strukturen zeigten hingegen ein sternförmiges, zelluläres Färbemuster, so dass davon ausgegangen werden kann, dass CD44 im gesunden Gehirn überwiegend von Astrozyten exprimiert wird (Abbildung 11 **D**).

Wie zu erwarten, waren im *Corpus callosum* von Kontrolltieren nur wenige Iba1 positive Zellen zu sehen. Diese waren gleichmäßig über die gesamte Fläche des *Corpus callosums* verteilt (Abbildung 13 **A** und 13 **B**). Wenn Zellkörper angeschnitten wurden waren diese schlank und meistens rund. Vom Zelleib abgehend waren bei größerer Auflösung dünne, meist verzweigte Fortsätze sichtbar. Insgesamt entspricht dies dem Bild einer sogenannten ruhenden Mikrogliazelle (Abbildung 13 **C**).

Zur Darstellung der Myelinscheiden wurde eine immunhistochemische Färbung gegen das Myelinprotein PLP durchgeführt. Diese zeigte eine weitestgehend homogene Färbung des gesamten *Corpus callosums*. Auch der unter dem *Corpus callosum* gelegene Fasertrakt „*Fornix hippocampi*“ zeigte sich vollständig myelinisiert. Der orthogonale Faserverlauf der

Balken versus *Fornix* Axone ist in dieser Färbung besonders gut zu sehen und hilft so bei der Abgrenzung der beiden Strukturen zueinander (Abbildung 14 **A** und 14 **B**).

Nach 2-4 tägiger Cuprizon-Intoxikation konnte keine augenscheinliche Erhöhung der anti-CD44-Immunreaktivität festgestellt werden (Abbildung 11 **E**, 11 **F**). Wie in den Kontrolltieren zeigte sich lose im *Corpus callosum* und teilweise auch im *Fornix* retikulär verteiltes CD44, ohne dass dieses einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen gewesen wäre.

Nur vereinzelt konnten CD44-positive astrozytäre Strukturen identifiziert werden.

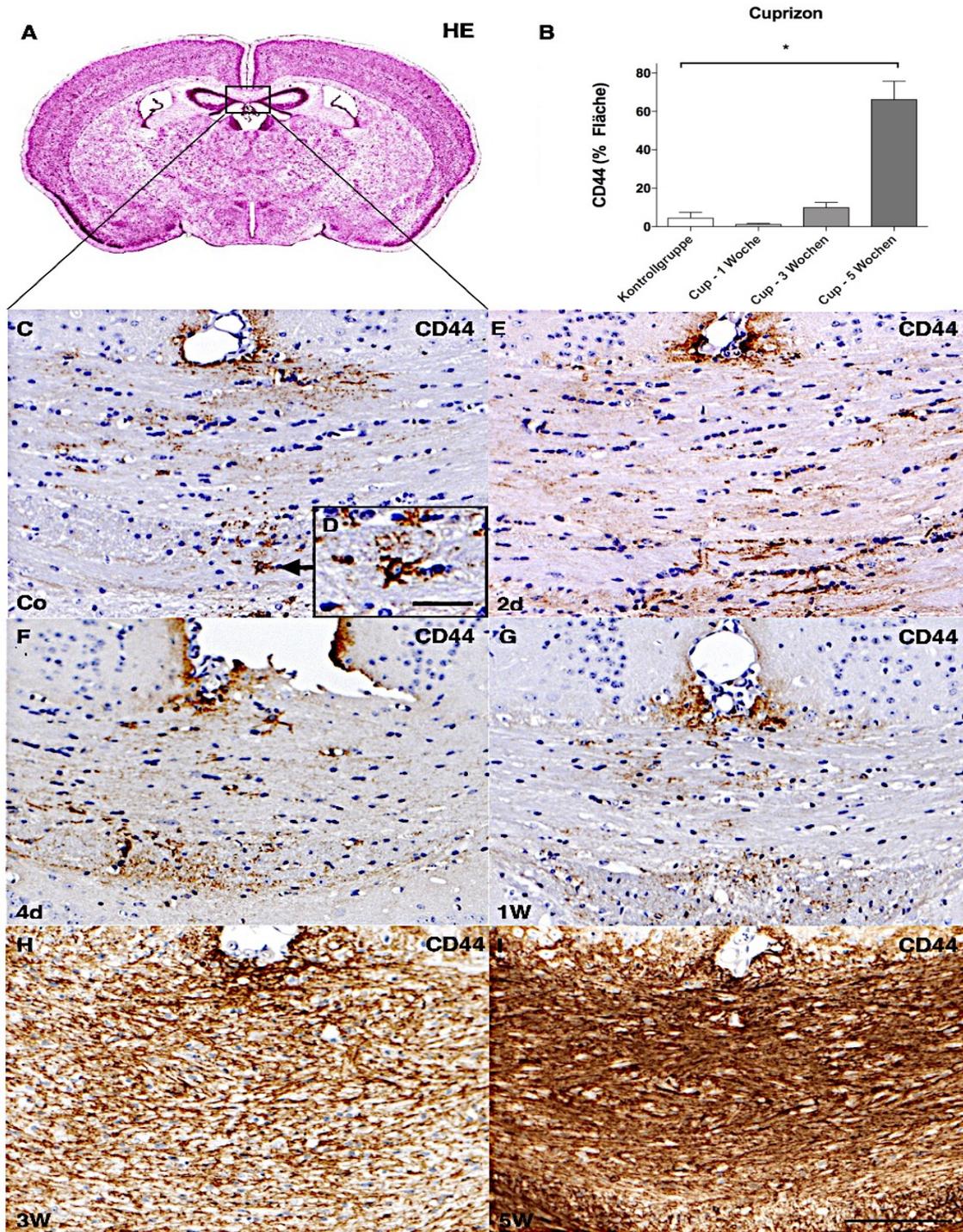


Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 im medialen Corpus callosum (mCC) eines Mäusehirns in der Initial- und Spätphase der Cuprizone-Intoxikation

(A) zeigt eine HE-Färbung auf Höhe des rostralen Hippokampus (Region 265) in der Übersicht (Sidman, Kosaras, Misra, & Senft, 2017). (B) zeigt den prozentualen Anteil von CD44 bei fortlaufender Cuprizone-Behandlung im medialen Teil des Corpus callosum (* $p=0,043$). (C) zeigt eine anti-CD44 immunhistochemische Färbung des medialen Corpus callosums bei einem Kontrolltier. (D) zeigt ein astrozytäres Färbemuster von CD44 im medialen Anteil des Corpus callosums bei einem Kontrolltier. (E) und (F) zeigen die gleiche Färbung in der Frühphase der Cuprizone-Intoxikation nach 2 und 4 Tagen. (G), (H) und (I) zeigen dieselbe Färbung in der Spätphase der Cuprizone-Intoxikation nach 1 Woche, 3 Wochen und 5 Wochen. Die Expression von CD44 im medialen Corpus callosum nimmt in der Spätphase der Cuprizone-Intoxikation deutlich zu.

Maßstab = 100 μ m (C, E, F, G, H, I); Maßstab = 25 μ m (D)

Um zu untersuchen, ob sich die CD44-Expression in späteren Phasen der Cuprizon-Intoxikation ändert, wurden weitere Versuchstiere für 3 und 5 Wochen mit Cuprizon behandelt und angefertigte Paraffinschnitte immunhistochemisch aufgearbeitet. In einem ersten Schritt wurden die typischen, im Cuprizon-Modell bekannten, histopathologischen Veränderungen wie Demyelinisierung und Mikrogliaaktivierung im *Corpus callosum* untersucht. Nach 3 Wochen zeigte die anti-PLP Färbung einen deutlichen Verlust der Immunreaktivität (Abbildung 14 **C**), insbesondere im Bereich des *medialen Corpus callosums* (Abbildung 14 **D**). Darüber hinaus konnte eine kortikale Demyelinisierung festgestellt werden (Abbildung 17 **D**). Übereinstimmend mit bereits veröffentlichten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigte der darunterliegende *Fornix* lediglich eine geringfügig verminderte anti-PLP Färbeintensität (Schmidt et al., 2013). Diese Region scheint trotz ihrem engen topographischen Bezug zum *Corpus callosum* nur in geringerem Ausmaß in den pathologischen Prozess miteinbezogen zu sein. In der anti-Iba1 Färbung war deutlich zu erkennen, dass nicht nur mehr (Hyperplasie), sondern auch größere (Hypertrophie) Mikrogliazellen im Bereich des betroffenen *Corpus callosums* zu finden sind (Abbildung 13 **D** und 13 **E**). Übereinstimmend mit einem aktivierten Phänotyp waren die Zellkörper nunmehr deutlich geschwollen, die Fortsätze zurückgezogen und deren Verzweigungen weniger klar ausgeprägt. In geringerer Intensität stellten sich diese Mikroglia-Veränderungen im Bereich des *Fornix* dar, nichtsdestotrotz deutlich gesteigert gegenüber der Kontrollgruppe. Diese phänotypische Veränderung der Mikrogliazellen nimmt bei fortlaufender Cuprizon-Intoxikation weiter zu und ist nach 5-wöchiger Behandlung noch stärker ausgeprägt (Abbildung 13 **F**, 13 **G**, 13 **H**).

In einem nächsten Schritt untersuchten wir die CD44-Expression in akut demyelinisierten Läsionen. Wie in Abbildung 11 **H** und 12 **C** dargestellt war bereits zum Zeitpunkt Woche 3 eine deutliche Zunahme der CD44-Expression zu erkennen. Im Vergleich mit frühen Zeitpunkten war kein zelluläres Färbemuster abzugrenzen. CD44 war vielmehr diffus im gesamten Bereich des betroffenen *Corpus callosums* erhöht exprimiert. Eine gesteigerte CD44-Expression war ebenfalls nach 5 Wochen Cuprizon-Intoxikation im Bereich des medialen *Corpus callosums* zu sehen (Abbildung 11 **I**, 12 **D**). Wie zum Zeitpunkt Woche 3 stellten sich die CD44-positiven Bereiche als diffuse, nicht an bestimmte zelluläre Strukturen gebundene, immunhistochemische bräunliche Färbung dar.

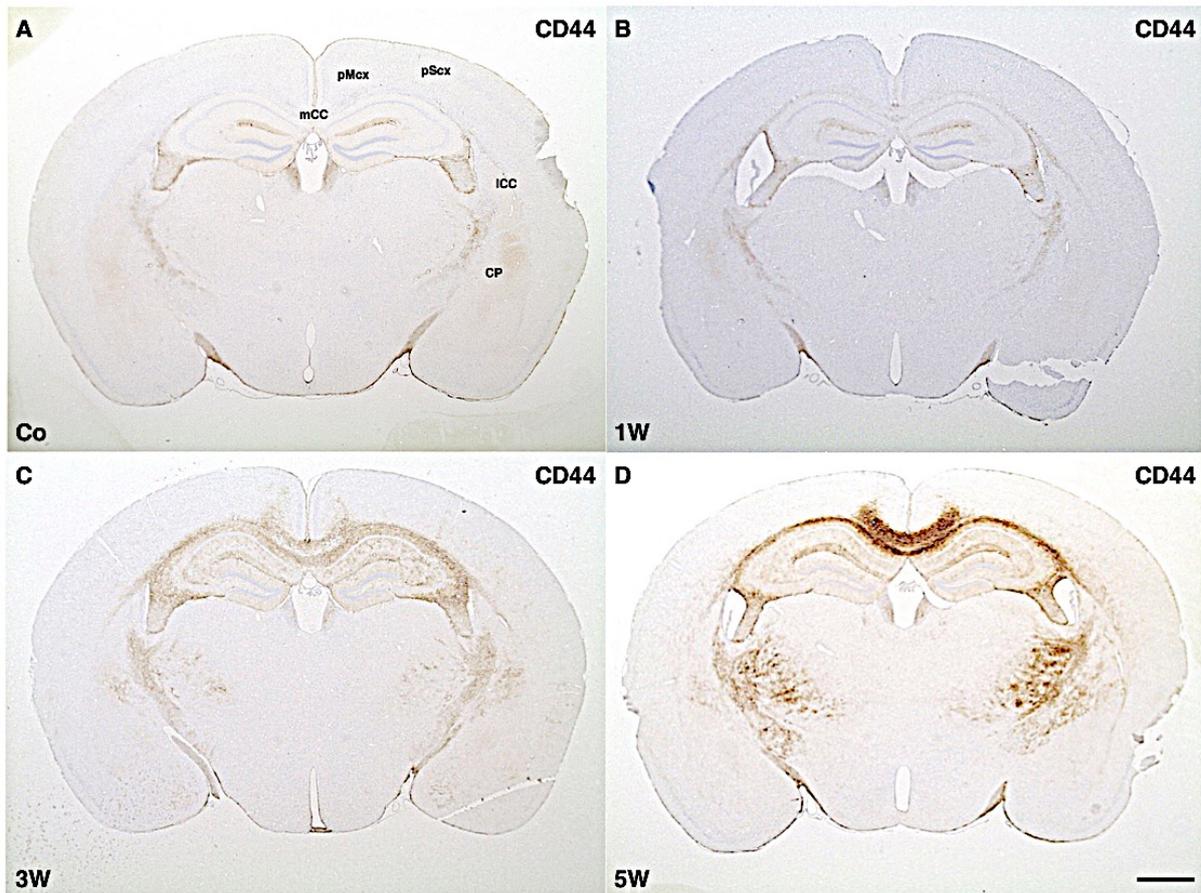


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 in der Spätphase der Cuprizone-Intoxikation

(A) zeigt eine anti-CD44 immunhistochemische Färbung eines Kontrolltiers auf Höhe des rostralen Hippokampus in der Übersicht. (B), (C) und (D) zeigen die gleiche Färbung nach 1 Woche, 3 Wochen und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation. Diese Abbildungen zeigen bei fortlaufender Cuprizone-Intoxikation besonders in den Bereichen des medialen Corpus callosums, lateralen Anteilen des Corpus callosums, in Teilen der Capsula interna und in tieferen Schichten (Layer V/VI) des primären somatosensorischen und primären somatomotorischen Kortex einen deutlichen Anstieg der CD44-Expression.

Maßstab = 1000 µm (A, B, C, D)

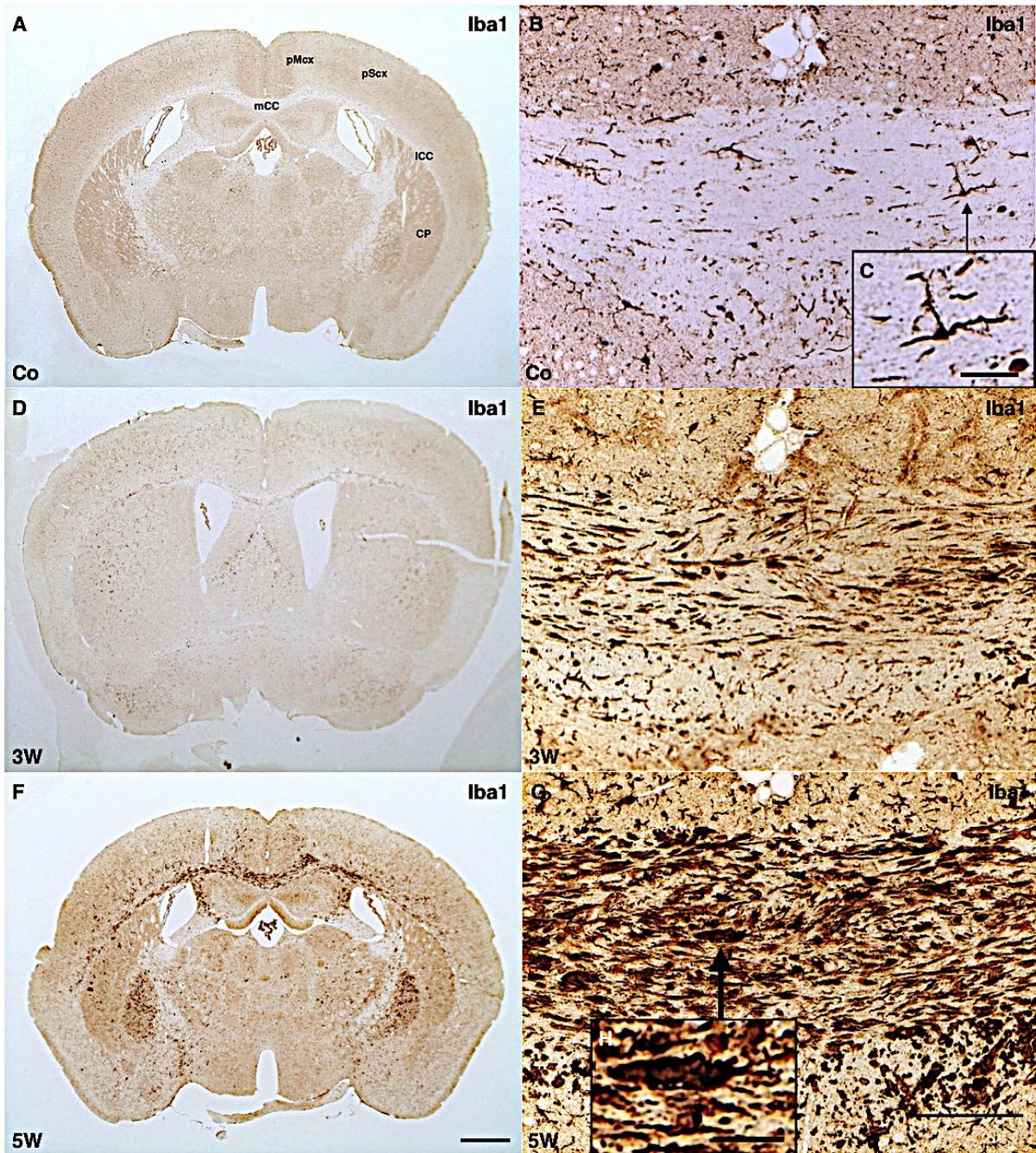


Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von Iba1 nach 3- 5-wöchiger (Spätphase) Cuprizone-Intoxikation

(A) zeigt eine anti-Iba1 immunhistochemische Färbung eines Kontrolltiers auf Höhe des rostralen Hippokampus in der Übersicht. (D) und (F) zeigen die gleiche Färbung nach 3 Wochen und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation. (B), (E) und (G) zeigen den medialen Anteil des Corpus callosums in höherer Vergrößerung. Hier ist eine ausgeprägte Mikrogliaaktivierung in den Cuprizone-behandelten Tieren zu sehen. (C) zeigt beispielhaft eine ruhende Mikrogliazelle im medialen Anteil des Corpus callosums. (H) zeigt eine aktivierte (hypertrophe) Mikrogliazelle bei Cuprizone-behandelten Tieren.

Maßstab = 1000 µm (A, D, F); Maßstab = 100 µm (B, E, G); Maßstab = 25 µm (C, H)

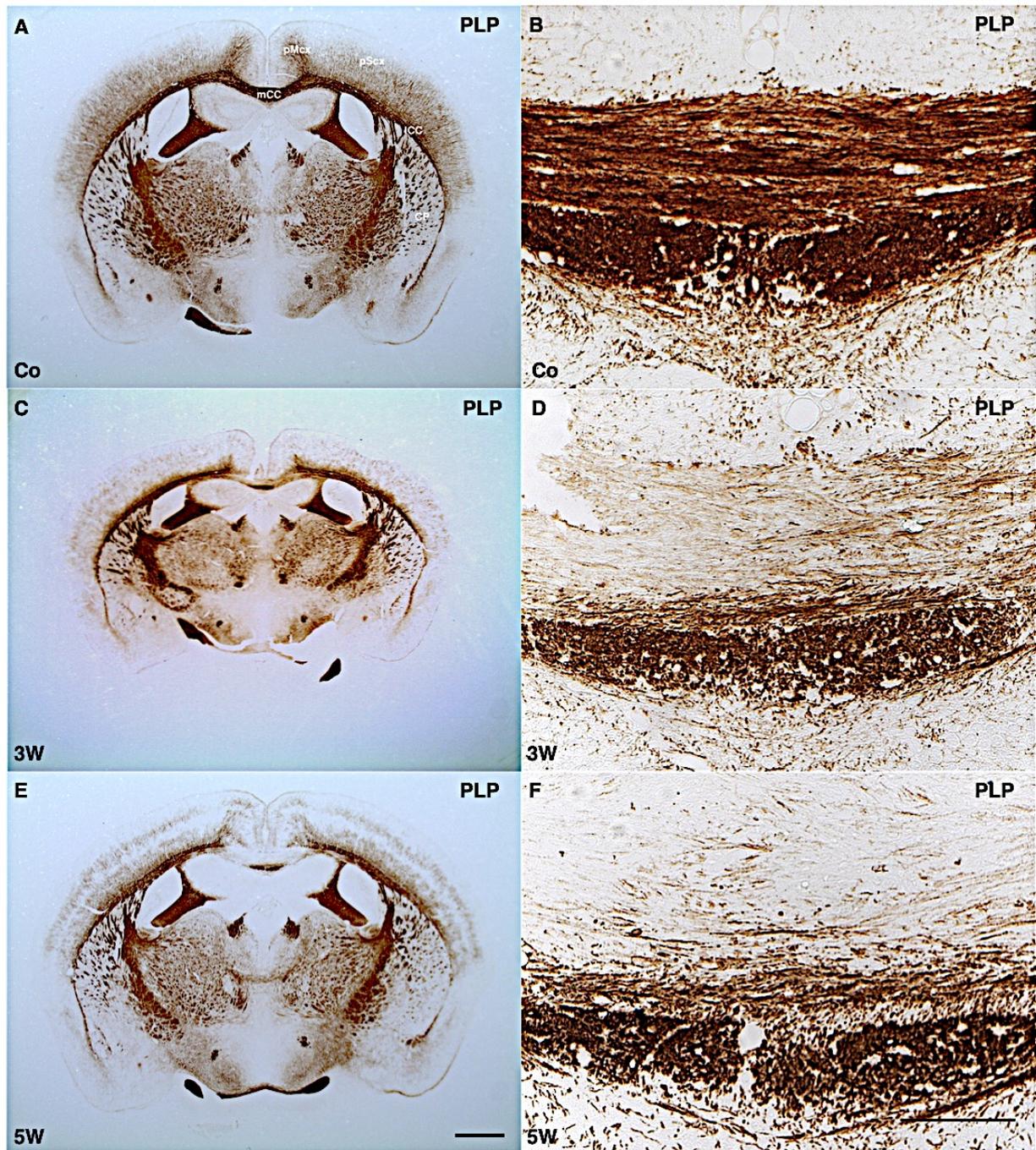


Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von PLP nach 3- 5-wöchiger (Spätphase) Cuprizin-Intoxikation

(A) zeigt eine anti-PLP immunhistochemische Färbung eines Kontrolltiers auf Höhe des rostralen Hippokampus in der Übersicht. (C) und (E) zeigen die gleiche Färbung nach 3 Wochen und 5 Wochen Cuprizin-Intoxikation. (B), (D) und (F) zeigen den medialen Anteil des Corpus callosums in höherer Vergrößerung. Hier zeigt sich eine ausgeprägte Demyelinisierung bei den Cuprizin-behandelten Tieren, vor allem im Bereich des medialen Corpus callosums.

Maßstab = 1000 µm (A, C, E); Maßstab = 100 µm (B, D, F)

Um auszuschließen, dass die beschriebene anti-CD44-Färbung einer unspezifischen Antikörperbindung zu Grunde liegt, wurden Negativkontrollen des jeweils gleich behandelten Versuchstieres angefertigt.

Hierbei wurden in einem separaten Experiment die Schnitte anstatt mit Primärantikörper (anti-CD44) mit Trägerlösung inkubiert. Parallel dazu wurden auch Schnitte mit Primärantikörper inkubiert (Positivkontrolle). Die Negativkontrolle wies im Vergleich zur Positivkontrolle keinerlei CD44-positiven Bereiche auf. Lediglich die durch die H-Gegenfärbung gefärbten Zellkerne waren deutlich erkennbar (Abbildung 15 **A**).

Im Gegensatz dazu zeigten sich in der Positivkontrolle die CD44-positiven Bereiche als diffuse, nicht an bestimmte Strukturen gebundene, immunhistochemische bräunliche Färbung (Abbildung 15 **B**). Deutlich erkennbar ist auch hier die geringere Intensität der anti-CD44-Färbung im Bereich des Fasertraktes „*Fornix hippocampi*“. Von einer spezifischen anti-CD44-Färbung kann somit ausgegangen werden.

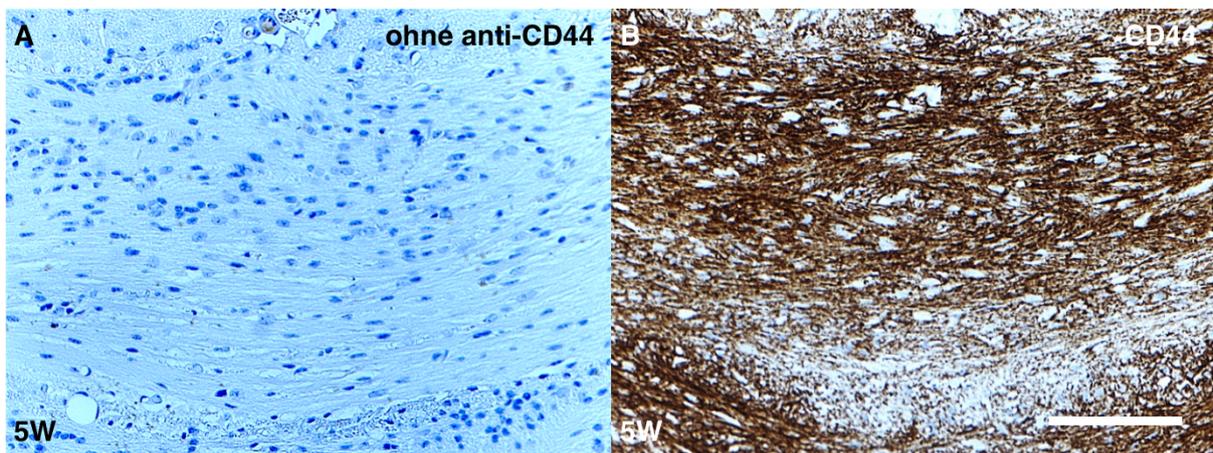


Abbildung 15: Negativ- und Positivkontrolle nach 5-wöchiger Cuprizin-Intoxikation

(A) zeigt eine Negativkontrolle nach 5-wöchiger Cuprizin-Intoxikation im Bereich des medialen Corpus callosums, ohne anti-CD44 Primärantikörper (wurde bei der immunhistochemischen Aufbereitung durch PBS ersetzt).

(B) zeigt eine Positivkontrolle nach 5-wöchiger Cuprizin-Intoxikation im Bereich des medialen Corpus callosums.

Anhand dieser beiden Kontrollen kann eine unspezifische Bindung des Antikörpers bei der immunhistochemischen Aufbereitung der Schnitte ausgeschlossen werden.

Maßstab = 100 µm (A, B)

Um die Intensität der anti-CD44-Färbung quantifizieren zu können wurde diese mit Hilfe einer densitometrischen Messung analysiert.

Dabei wurde der prozentuale Anteil der CD44-positiven Bereiche in der ROI, dem medialen Anteil des *Corpus callosums*, während der verschiedenen Phasen der Cuprizin-Intoxikation gemessen. Die Versuchsgruppen wurden hinsichtlich ihrer anti-CD44-Immunreaktivität ausgewertet und miteinander verglichen (Abbildung 11 **B**).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe ($4,64 \pm 2,84$ (Mittelwert \pm SEM)) zeigte sich nach Woche 1 noch kein Unterschied in der Färbeintensität. Erst nach 3-wöchiger Cuprizin-Intoxikation war eine deutliche Zunahme der anti-CD44-Immunreaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen. Nach 5-wöchiger Cuprizin-Intoxikation war die anti-CD44-Farbintensität im Vergleich zu Kontrollgruppe signifikant erhöht ($66,31 \pm 9,40$ (Mittelwert \pm SEM); $p < 0,043$).

Nachdem eine erhöhte CD44-Expression an 3 und 5 Wochen Cuprizin behandelten Tieren gezeigt werden konnte, untersuchten wir nun, ob ein Zusammenhang zwischen der Mikrogliose, dem Demyelinisierungsgrad und der Expression von CD44 in akut demyelinisierten Läsionen besteht.

Wie bereits durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, induziert eine Cuprizin-Intoxikation nicht nur im Bereich des medialen *Corpus callosums*, sondern auch in anderen Regionen des Gehirns charakteristische histopathologische Veränderungen (Markus Kipp & Baumgartner, 2011). Neben lateralen Anteilen des *Corpus callosums* sind auch Teile des Kortex (primär somatosensorischer (pScx) und primärer somatomotorischer Kortex (pMcx)) und die *Capsula interna* (CI) mit umgebenden Regionen der weißen Substanz teilweise demyelinisiert. Aus verschiedenen Gründen ist die begleitende Mikrogliaaktivierung in den genannten Bereichen jedoch geringer ausgeprägt. Zum einen induziert eine Cuprizin-Intoxikation in diesen Bereichen nur eine subtotale Demyelinisierung und zum anderen sind diese ZNS-Bereiche *a priori* weniger stark myelinisiert, die anfallenden Abfallprodukte des Myelins deswegen auch geringer. Beide Faktoren führen dazu, dass der Kortex und die *Capsula interna* eine geringere Mikrogliose aufzeigen im Vergleich zum komplett demyelinisierten Bereich des *medialen Corpus callosums*.

In einem nächsten Schritt untersuchten wir die anti-CD44-Immunreaktivität in diesen zusätzlichen Gehirnregionen. In den Abbildungen sind für die jeweilige Gehirnregion zur Orientierung auch anti-PLP und anti-Iba1 Färbungen dargestellt.

Im Bereich des lateralen *Corpus callosums* konnte eine inkomplette Demyelinisierung beobachtet werden (Abbildung 16 **D**). Diese wird von einer mäßig ausgeprägten Mikrogliaaktivierung begleitet (Abbildung 16 **E**). Überraschenderweise sind auch diese subtotalen demyelinisierten Bereiche der Balkenstrahlung durch eine ausgeprägte anti-CD44-Immunreaktivität gekennzeichnet (Abbildung 16 **F**).

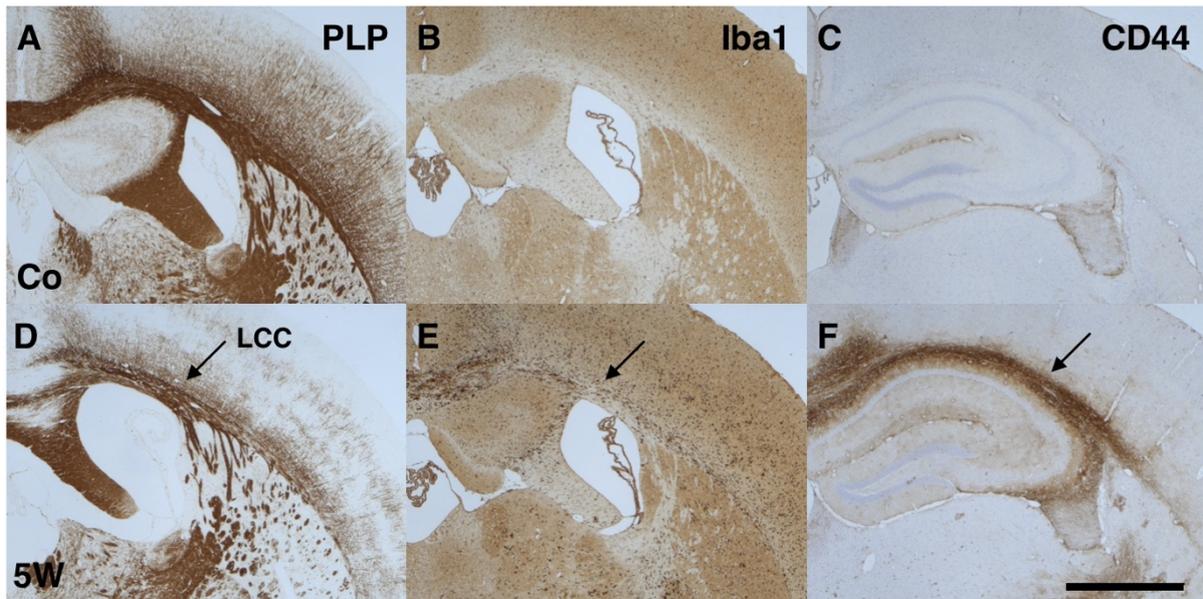


Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von PLP, Iba1 und CD44 in lateralen Anteilen des Corpus callosums (LCC) eines Mäusegehirns vergleichend bei Kontrolltieren und in der Spätphase der Cuprizin-Intoxikation

(A) und (D) zeigen eine anti-PLP immunhistochemische Färbung im Bereich des lateralen Corpus callosums bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizin-Intoxikation. (B) und (E) zeigen eine anti-Iba1 immunhistochemische Färbung der gleichen Region bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizin-Intoxikation. (C) und (F) zeigen eine anti-CD44 immunhistochemische Färbung der gleichen Region bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizin-Intoxikation. Nach 5-wöchiger Cuprizin-Intoxikation ist deutlich zu erkennen, dass es neben einer submaximalen Demyelinisierung und der gesteigerten Mikrogliaaktivität auch zu einer erhöhten Expression von CD44 im Bereich des lateralen Corpus callosums kommt.

Maßstab = 1000µm (A, B, C, D, E, F)

Anders verhält es sich in kortikalen Schichten. Wie in Abbildung 17 dargestellt, sind weite Teile des primär somatosensorischen (pScx) als auch des primär somatomotorischen Kortex (pMcx) demyelinisiert. Reste von Myelinfasern sind vor allem im Bereich der *Lamina granularis interna* (Lamina IV) des pScx als auch in tiefen kortikalen Schichten des pScx und des pMcx auszumachen (Abbildung 17 D). Auch im Kortex ist eine deutliche Mikrogliaaktivierung festzustellen (Abbildung 17 E). Diese ist jedoch im Vergleich zum medialen Anteil des Balkens weniger stark ausgeprägt und darüber hinaus bestehen schichtenspezifische Unterschiede. Am deutlichsten ist diese in tiefen kortikalen Schichten sowie im Bereich der *Lamina granularis interna* (Lamina IV) des pScx auszumachen. Anti-CD44 ist ausschließlich in den tiefen Schichten des Kortex im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht exprimiert. Insbesondere in den weiter oberflächlich gelegenen *Laminae* konnte trotz vorhandener Demyelinisierung und Mikroglia-Aktivierung keine gesteigerte anti-CD44-Immunreaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 17 F).

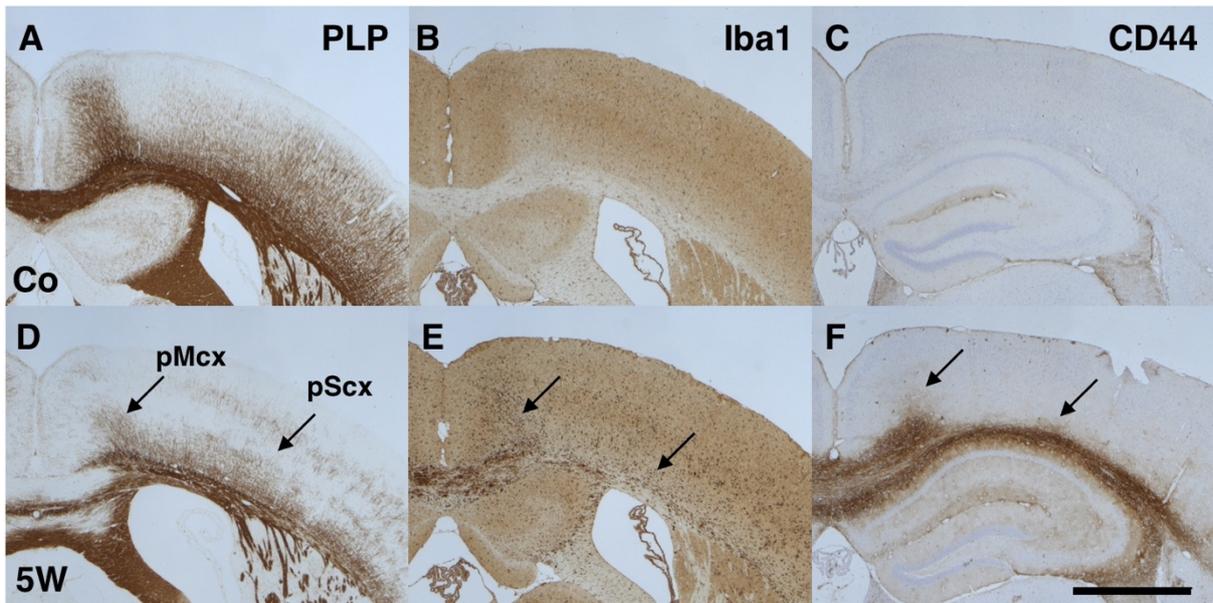


Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis von PLP, Iba1 und CD44 in primär somatomotorischen (pMcx) und primär somatosensorischen (pScx) Anteilen des Kortex eines Mäusehirns vergleichend bei Kontrolltieren und in der Spätphase der Cuprizin-Intoxikation

(A) und (D) zeigen eine anti-PLP immunhistochemische Färbung im Bereich des primär somatomotorischen und primär somatosensorischen Kortex bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizin-Intoxikation. (B) und (E) zeigen eine anti-Iba1 immunhistochemische Färbung der gleichen Region bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizin-Intoxikation. (C) und (F) zeigen eine anti-CD44 immunhistochemische Färbung der gleichen Region bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizin-Intoxikation. Nach 5-wöchiger Cuprizin-Intoxikation ist deutlich zu erkennen, dass es neben einer Demyelinisierung und der gesteigerten Mikrogliaaktivität auch zu einer erhöhten Expression von CD44 in tiefen Schichten des primär somatomotorischen und primär somatosensorischen kommt.

Maßstab = 1000µm (A, B, C, D, E, F)

Ähnlich wie in den zuvor beschriebenen Hirnregionen, lassen sich die Ergebnisse auch im Bereich der *Capsula interna* und umgebende Regionen der weißen Substanz bestätigen (Abbildung 18). In dieser Hirnregion wurde sowohl in der anti-PLP (Abbildung 18 D), als auch in der anti-Iba1 Färbung (Abbildung 18 E) ein deutlicher Verlust des Myelinisierungsgrades und eine gesteigerte Mikrogliose festgestellt. Zudem kann eine erhöhte anti-CD44-Immunreaktivität auch hier eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 18 F).

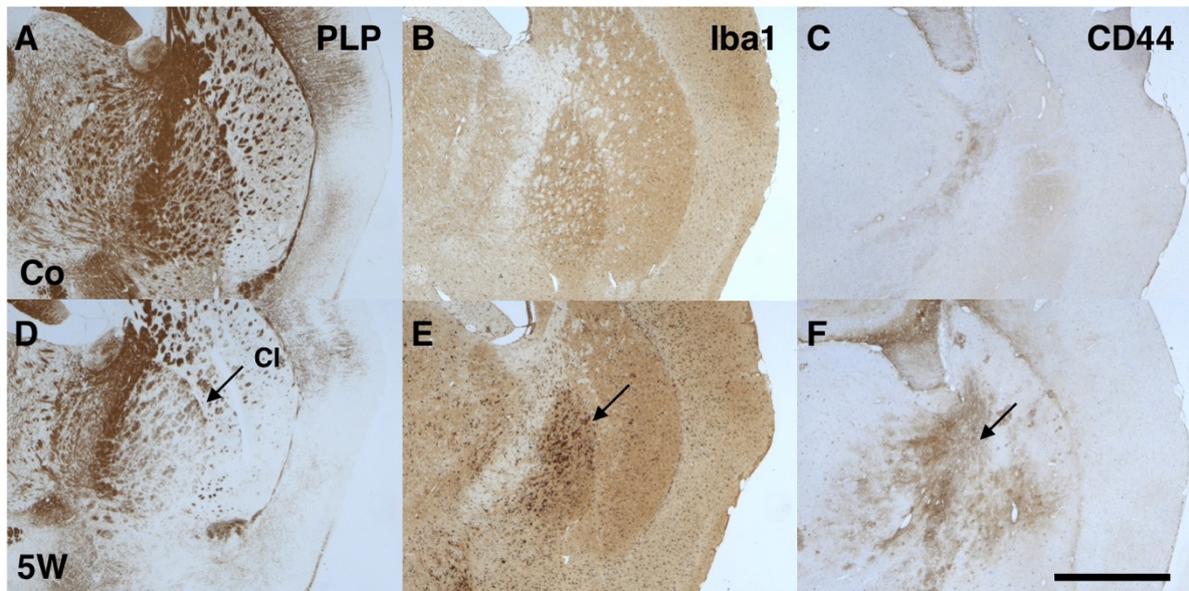


Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von PLP, Iba1 und CD44 in Anteilen der Capsula interna und umgebende Regionen der weißen Substanz eines Mäusegehirns vergleichend bei Kontrolltieren und in der Spätphase der Cuprizone-Intoxikation

(A) und (D) zeigen eine anti-PLP immunhistochemische Färbung im Bereich der Capsula interna bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation. (B) und (E) zeigen eine anti-Iba1 immunhistochemische Färbung der gleichen Region bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation. (C) und (F) zeigen eine anti-CD44 immunhistochemische Färbung der gleichen Region bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation. Nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation ist deutlich zu erkennen, dass es neben einer erhöhten Demyelinisierung und der gesteigerten Mikrogliaaktivität auch zu einer erhöhten Expression von CD44 im Bereich der Capsula interna kommt.

Maßstab = 1000µm (A, B, C, D, E, F)

Zusammenfassend konnten wir durch unsere Untersuchungen bisher zeigen, dass eine Cuprizone-induzierte Demyelinisierung von einer gesteigerten CD44-Expression begleitet wird. Dies trifft vor allem auf Bereiche der weißen Substanz zu, wohingegen kortikale Demyelinisierung nur teilweise, und zwar in tiefen Schichten, von einer CD44-Induktion begleitet wird. In allen untersuchten Hirnregionen stellen sich die CD44-positiven Bereiche als diffuse, nicht an bestimmte zelluläre Strukturen gebundene, immunhistochemische bräunliche Färbung dar.

3.2 Erhöhte CD44-Expression bei aktiver EAE-Immunisierung mit T-Zell Beteiligung

Das Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE-Modell) ist neben dem Cuprizin-Modell eines der wichtigsten Tiermodelle zur Erforschung von neuroinflammatorischen Erkrankungen wie der MS. Anders als beim Cuprizin-Modell stehen bei der aktiven EAE-Immunisierung die autoimmunvermittelten Aspekte der MS im Mittelpunkt. Um das heterogene Krankheitsbild der MS besser verstehen zu können, bedient man sich in der MS-Forschung unterschiedlicher experimenteller Tiermodelle, welche bestimmte Teilaspekte der Erkrankung rekapitulieren.

Bei der vorliegenden Arbeit wurden die Versuchstiere mit einem Fragment des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins (MOG₃₅₋₅₅-Peptid) aktiv immunisiert, wodurch es bei den behandelten Tieren nach ca. 9-14 Tagen zum Ausbruch einer EAE gekommen ist. Diese zeigt sich klinisch durch Lähmungen der Versuchstiere mit progredienten Krankheitsverlauf, beginnend im Bereich des Schwanzes und der Hinterläufe.

Da die inflammatorisch-demyelinisierenden Herde der EAE primär im Bereich des Rückenmarks zu finden sind, wurde dieses sowie umgebende Strukturen im Rahmen dieser Studie analysiert.

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob durch eine aktive Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ neben inflammatorisch-demyelinisierenden Herden auch eine erhöhte CD44-Expression im Rückenmark beobachtet werden kann.

Hierzu wurde mit Hilfe einer anti-CD44 immunhistochemischen Färbung die Expression von CD44 sowohl in der Kontrollgruppe (Abbildung 19) als auch in aktiv immunisierten Tieren (Abbildung 20) visualisiert und anschließend miteinander verglichen.

In Abbildung 19 ist eine repräsentative anti-CD44-Färbung auf Höhe des thorakalen Rückenmarks dargestellt. Schon in geringerer Vergrößerung kann festgestellt werden, dass die anti-CD44-Immunreaktivität in der zentral gelegenen grauen Substanz weniger deutlich ausgeprägt ist als in der umgebenden weißen Substanz (Abbildung 19 E). Lediglich unmittelbar um den *Canalis centralis* (Abbildung 19 F) konnte eine deutliche anti-CD44-Färbung festgestellt werden. Auffällig ist auch, dass am dorsalen Enden des Hinterhorns, im Bereich der Fasern des Lissauer-Trakts (Abbildung 19 H und 19 I), eine deutlich verstärkte anti-CD44-Färbung festgestellt werden kann. Die insgesamt stärkere Färbung der weißen Substanz zeigt alles in allem ein retikuläres / filiformes Färbemuster (Abbildung 19 C, 19 D), was am ehesten einer astrozytären Expression entspricht. Der das Rückenmark umgebende Wirbelkörper zeigte keine Anfärbung, wohl aber Zellen des hämatopoetischen Systems (Abbildung 19 A und 19 B). Ganz deutlich ist hier eine zytoplasmatische Färbung zu sehen.

In einem zweiten Schritt untersuchten wir nun die anti-CD44-Immunreaktivität bei Versuchstieren nach aktiver EAE-Immunisierung in diesen Regionen. Die Versuchstiere

wurden 14 Tage nach Immunisierung transkardial perfundiert und immunhistologisch aufgearbeitet.

Wie in Abbildung 20 dargestellt entspricht das generelle Färbemuster nach MOG₃₅₋₅₅-induzierter EAE dem der Kontrolltiere. CD44 ist höher in der weißen als in der grauen Substanz exprimiert. Im Bereich der Wirbelkörper zeigt das Knochengewebe keine anti-CD44-Immunreaktivität, Blutzellen stellen sich hingegen deutlich positiv dar (Abbildung 20 **A** und 20 **B**). Im direkten visuellen Vergleich der Kontroll- versus EAE-Gruppe lässt sich feststellen, dass CD44 in allen untersuchten Regionen in MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Tieren stärker exprimiert ist als in Kontrolltieren (Abbildung 20 **A-I**). Auffallend ist vor allem, dass so gut wie alle Zellen des hämatopoetischen Systems nunmehr CD44 im Zytoplasma bzw. auf ihrer Plasmamembran exprimieren.

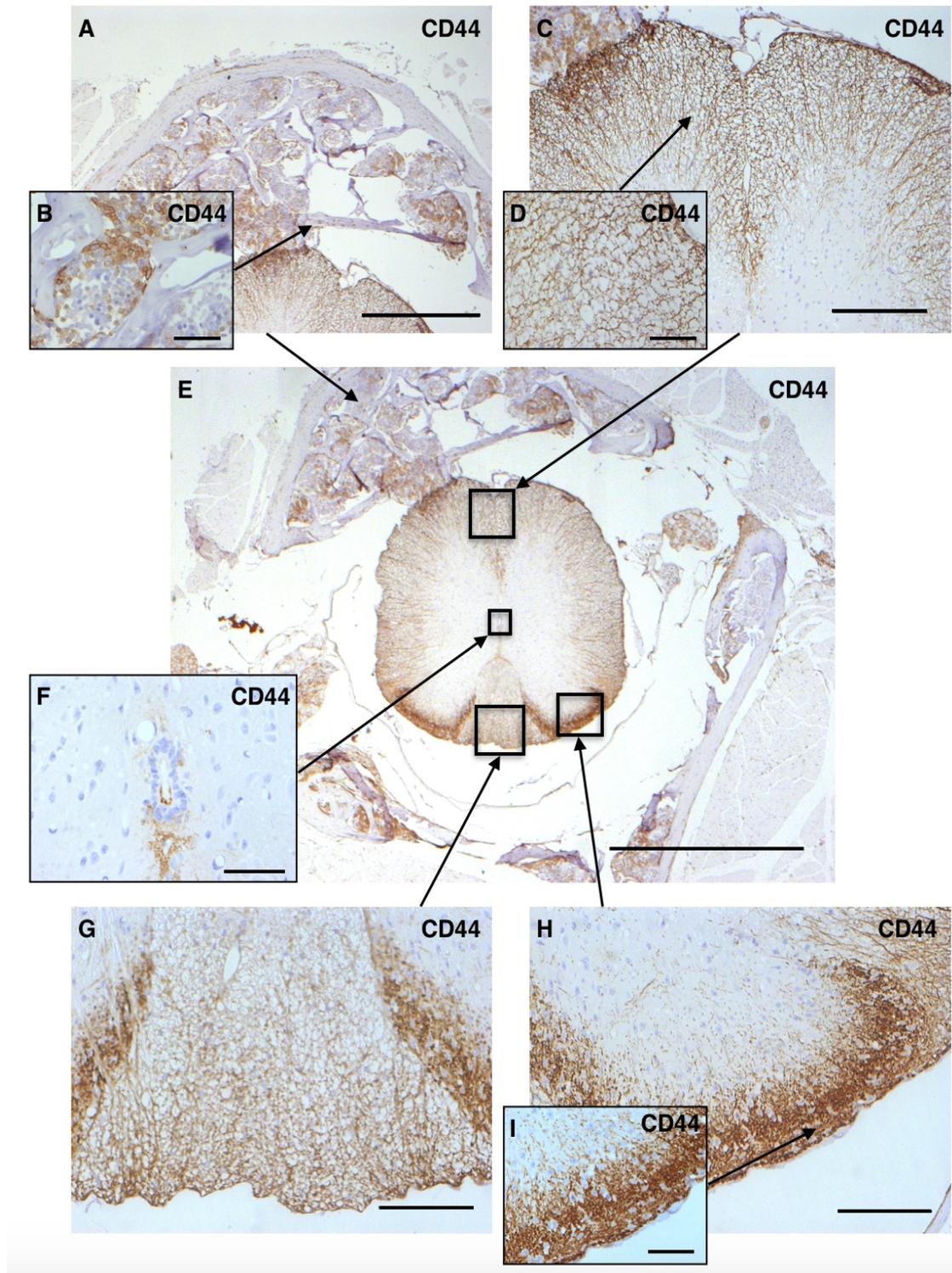


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 im Rückenmark eines Kontrolltieres

(A) und (B) zeigen eine anti-CD44 immunhistochemische Färbung des Corpus vertebrae; (C) und (D) zeigen die gleiche Färbung im Bereich der Fissura mediana anterior; (E) zeigt eine anti-CD44 immunhistochemische Färbung des Rückenmarks und dessen umgebende Strukturen eines Kontrolltieres im Überblick; (F) zeigt die gleiche Färbung im Bereich des Canalis centralis; (G) zeigt die gleiche Färbung im Bereich des Funiculus posterior; (H) und (I) zeigen die gleiche Färbung im Bereich des Cornu posterior. Insgesamt ist deutlich zu erkennen, dass sowohl im gesamten Bereich der Substantia alba des Rückenmarks als auch im Bereich der Spongiosa des Corpus vertebrae des Kontrolltieres eine CD44-Expression immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Maßstab = 500 μm (A); Maßstab = 50 μm (B, D, F, I); Maßstab = 200 μm (C); Maßstab = 1000 μm (E); Maßstab = 100 μm (G, H)

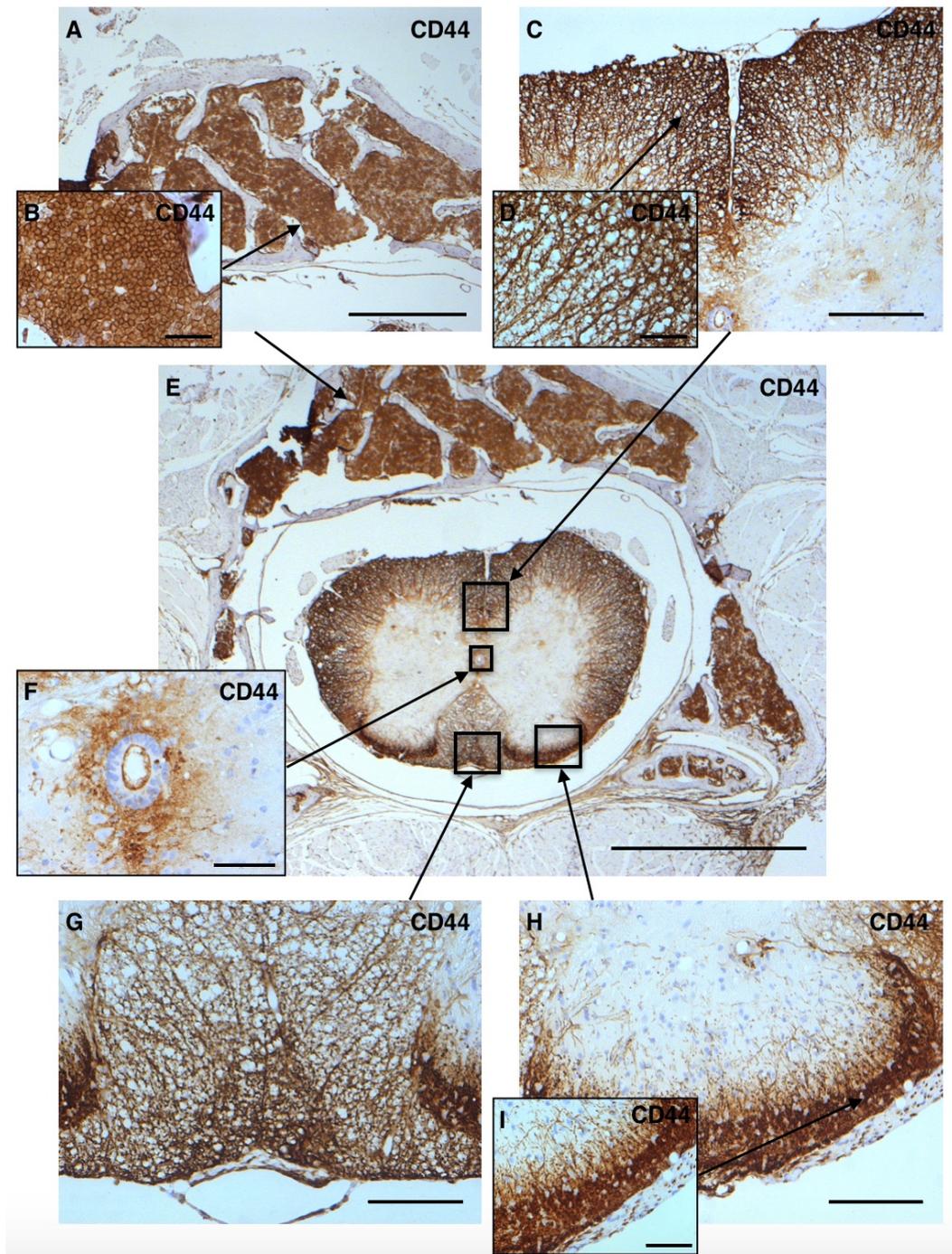


Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 im Rückenmark einer Maus nach aktiver EAE-Immunisierung

(A) und (B) zeigen eine anti-CD44 immunhistochemische Färbung des Corpus vertebrae; (C) und (D) zeigen die gleiche Färbung im Bereich der Fissura mediana anterior; (E) zeigt eine anti-CD44 immunhistochemische Färbung des Rückenmarks und dessen umgebende Strukturen eines Versuchstieres nach aktiver EAE-Immunisierung im Überblick; (F) zeigt die gleiche Färbung im Bereich des Canalis centralis; (G) zeigt die gleiche Färbung im Bereich des Funiculus posterior; (H) und (I) zeigen die gleiche Färbung im Bereich des Cornu posterior. Insgesamt kann im gesamten Bereich der Substantia alba als auch im Bereich der Spongiosa des Corpus vertebrae einer aktiv EAE immunisierten Maus eine erhöhte CD44-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe immunhistochemisch nachgewiesen werden. Im Bereich der Substantia grisea hingegen ist die CD44-Expression nur punktuell sehr leicht erhöht, dort vor allem um den Canalis centralis.

Maßstab = 500 µm (A); Maßstab = 50µm (B, D, F, I); Maßstab = 200 µm (C); Maßstab = 1000 µm (E); Maßstab = 100µm (G, H)

3.3 Erhöhte CD44-Expression nach toxisch induzierter Demyelinisierung in Kombination mit einer aktiven EAE-Immunsierung

Das Cup-EAE-Modell ist ein von unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Tiermodell, welches die toxisch induzierte Demyelinisierung mit einer aktiven EAE-Immunsierung kombiniert (Scheld et al., 2016).

Die Versuchstiere wurden einer insgesamt 7-wöchigen Behandlung unterzogen. Anfangs erhielten sie für 3 Wochen mit Cuprizon versetztes Futter (0,25%), was unter anderem zu einer toxisch induzierten Demyelinisierung des *medialen Corpus Callosums* (mCC) führt (Goldberg et al., 2015). In der 4. und 5. Woche findet eine autonome Läsionsprogression statt. Nach der 5. Woche wurden die Tiere aktiv mit einem Fragment des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins (MOG₃₅₋₅₅-Peptid) immunisiert. Dadurch kommt es nach 9-14 Tagen zu Lähmungserscheinungen, beginnend im Bereich des Schwanzes und der Hinterläufe. Nach der 7. Woche erfolgte die transkardiale Perfusion der Tiere unter Analgesie und die anschließende Fixation der Gewebeprobe.

Die Cup-EAE Behandlung führt zu inflammatorisch-demyelinisierten Herden in Form von perivaskulären Infiltraten (Abbildung 21) (Scheld et al., 2016). Diese sind prinzipiell im gesamten ZNS zu finden. Wir verglichen die Expression von CD44 in perivaskulären Bereichen unterschiedlicher Tiermodelle (Cup-EAE, Cup, Cup + Pertussis Toxin (PTX), EAE) miteinander.

In Kontrolltieren wurde CD44 perivaskulär vor allem in folgenden Gehirnregionen exprimiert: periventrikulär, im Bereich der *Membrana limitans gliae superficialis*, dem *Tractus opticus*, dem *Plexus choroideus* und der *Tela choroidea*. Gefäße außerhalb dieser Regionen waren CD44-negativ.

In einem nächsten Schritt untersuchten wir die CD44-Expression in perivaskulären Infiltraten von Cup-EAE behandelten Tieren. Läsionen waren im *Corpus callosum* (Abbildung 22 **C**), der *Fimbria hippocampi* (Abbildung 22 **E**), und dem *Corpus striatum* (Abbildung 22 **G**) lokalisiert. Hierbei zeigten sich bei einem Großteil der Gefäße sowohl CD44-positive Zellen im Virchow-Robin-Raum (Abbildung 23 **C**) als auch im umliegenden Parenchym (Abbildung 23 **D**, 23 **E**). CD44-Positivität war nur dann in nicht entzündlich veränderten Gefäßen vorhanden, wenn diese in Cuprizon-demyelinisierten Gehirnregionen lagen (Abbildung 23 **B**). Gefäße anderer Gehirnregionen waren CD44-negativ (Abbildung 23 **A**).

Entsprechend den Ergebnissen aus Cup-EAE behandelten Tieren waren nach 3-wöchiger Cuprizon-Intoxikation nur solche Gefäße CD44-positiv, die (i) entweder in Cuprizon-vulnerablen Regionen liegen oder aber (ii) auch in Kontrolltieren CD44-positiv sind (Abbildung 24 **B**, 24 **D**). Gefäße außerhalb der oben genannten Regionen waren auch in diesem

Tiermodell CD44-negativ. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei Tieren nach einer Kombinationsbehandlung aus Cuprizin in Verbindung mit PTX.

In einem letzten Schritt untersuchten wir Gefäße von Tieren nach einer alleinigen aktiven EAE-Immunsierung. Wie zu erwarten zeigten sich in den Großhirnen dieser Tiere nur sehr wenige perivaskuläre Infiltrate (Abbildung 24 C, 24 E, 24 F). Falls vorhanden waren diese CD44-positiv. „Normale“ nicht inflammatorische Gefäße waren CD44-negativ.

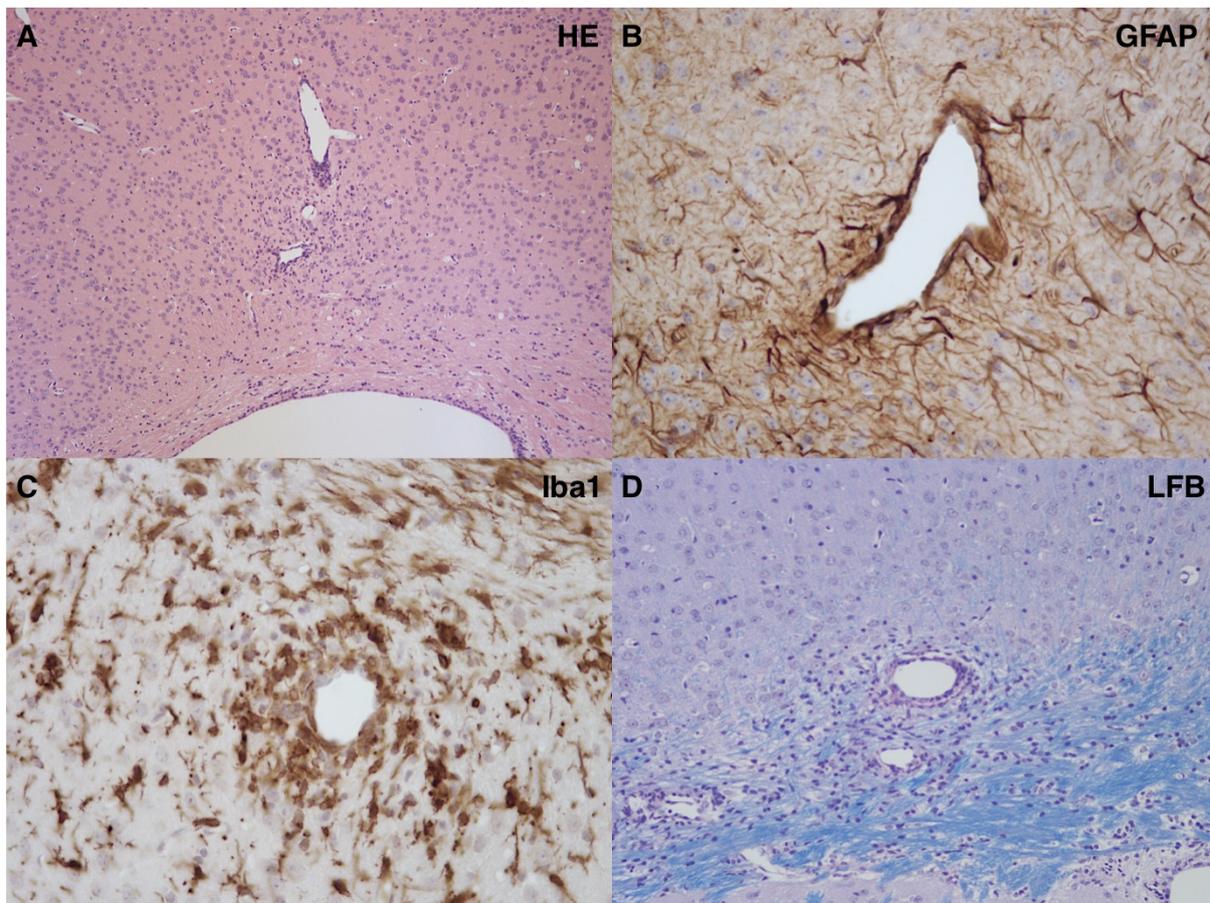


Abbildung 21: Exemplarische Darstellung von perivaskulären Infiltraten in verschiedenen immunohistochemischen Färbungen eines Mäusegehirns

(A) zeigt ein perivaskuläres Infiltrat in der HE-Färbung eines Mäusegehirns. (B) zeigt ein perivaskuläres Infiltrat in der GFAP Färbung eines Mäusegehirns. (C) zeigt ein perivaskuläres Infiltrat in der Iba1 Färbung eines Mäusegehirns. (D) zeigt ein perivaskuläres Infiltrat in der LFB/PAS-Färbung eines Mäusegehirns.

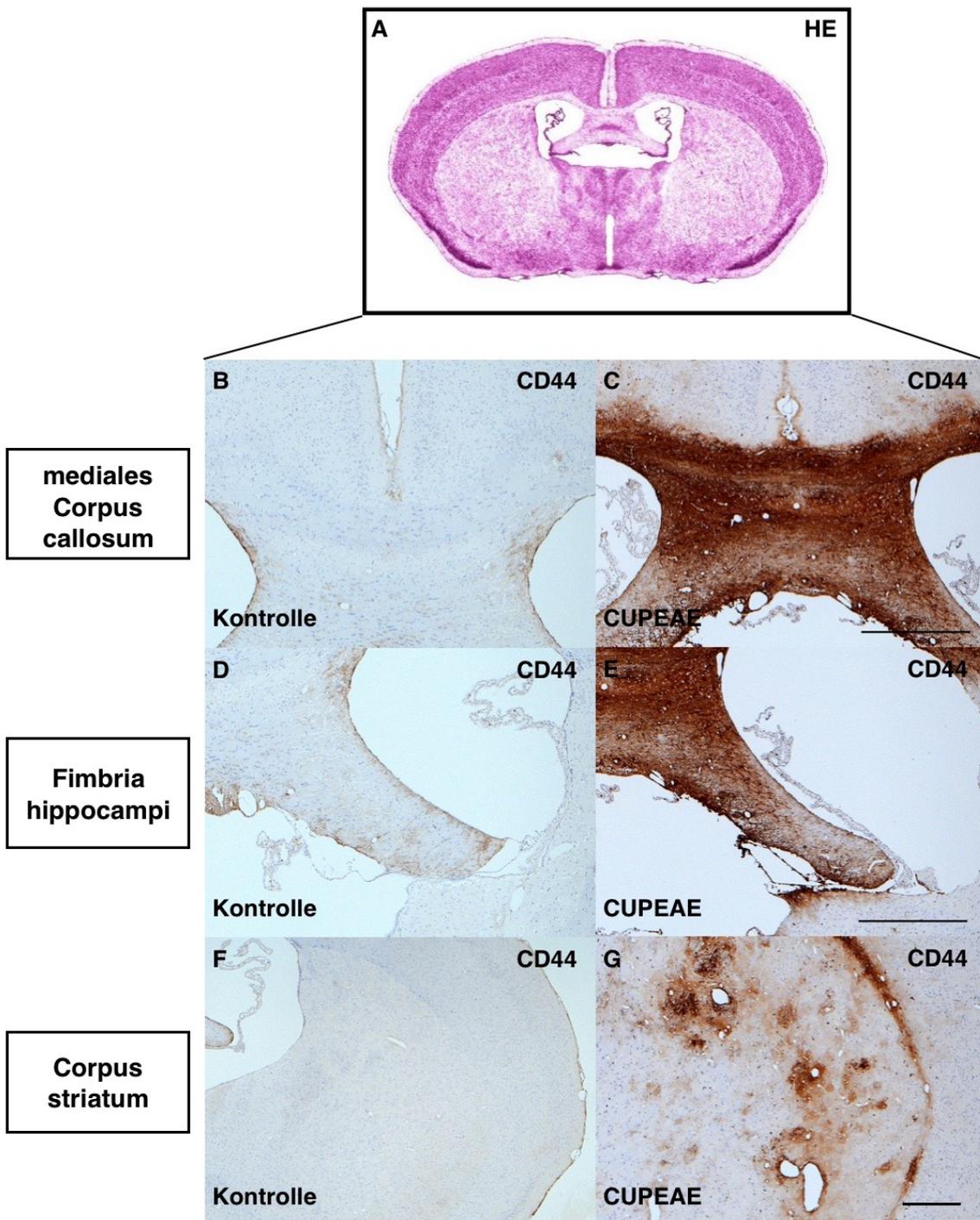


Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 in einem Mäusegehirn nach toxisch induzierter Demyelinisierung in Kombination mit einer aktiven EAE-Immunisierung

(A) zeigt eine HE-Färbung auf Höhe des Hippokampus (Region 235) in der Übersicht (Sidman et al., 2017). (B), (D) und (F) zeigen eine anti-CD44 immunhistochemische Färbung des medialen Corpus callosums, der Fimbria hippocampi und dem Corpus striatum eines Kontrolltieres. (C), (E) und (G) zeigen die gleiche Färbung des medialen Corpus callosums, der Fimbria hippocampi und dem Corpus striatum nach toxisch induzierter Demyelinisierung in Kombination mit einer aktiven EAE-Immunisierung.

Deutlich zu erkennen ist die erhöhte Expression von CD44 nach toxisch induzierter Demyelinisierung in Kombination mit einer aktiven EAE-Immunisierung im Vergleich zur Kontrollgruppe in den oben genannten Regionen. Aber speziell auch perivaskuläre Bereiche zeigten eine erhöhte CD44-Immunreaktivität.

Maßstab = 500µm (B, C, D, E, F, G);

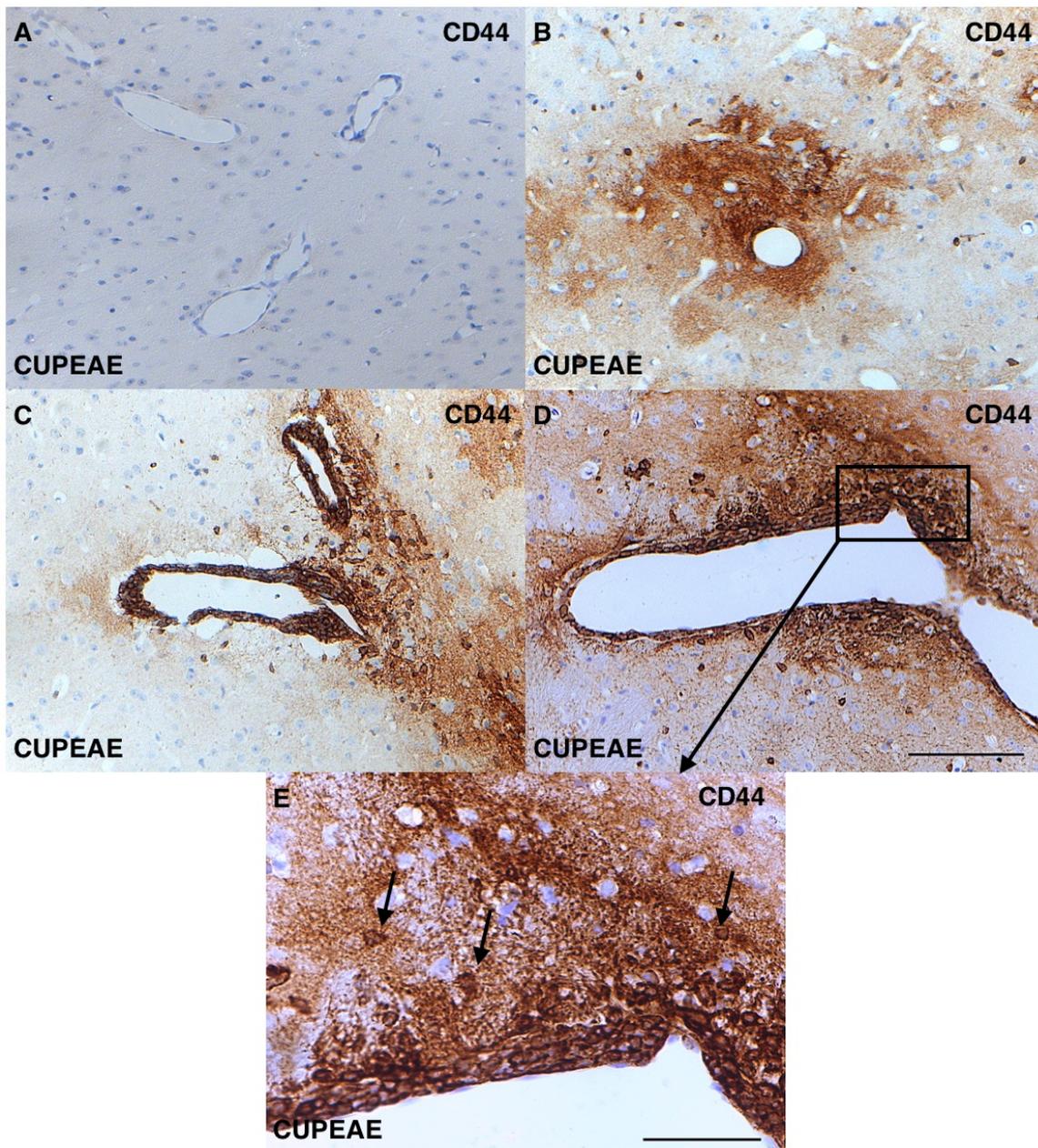


Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 in perivaskulären Bereichen eines Mäusehirns nach toxisch induzierter Demyelinisierung in Kombination mit einer aktiven EAE-Immunisierung

(A) zeigt CD44-negative Gefäße nach toxisch induzierter Demyelinisierung in Kombination mit einer aktiven EAE-Immunisierung in einer anti-CD44 immunhistochemischen Färbung. (B) zeigt in der gleichen Färbung fokale um das Gefäßlumen angeordnete CD44-positive Bereiche. (C) zeigt in der gleichen Färbung CD44-positive Zellen im Virchow-Robin-Raum von Gefäßen. (D) zeigt in der gleichen Färbung ein perivaskuläres Infiltrat mit CD44-positiven, in das umgebende Parenchym eingewanderte, inflammatorische Zellen. (E) zeigt die gleiche Färbung in höherer Vergrößerung.

Bei Versuchstieren nach toxisch induzierter Demyelinisierung in Kombination mit einer aktiven EAE-Immunisierung lassen sich sowohl CD44-negative als auch CD44-positive Gefäße nachweisen. Bei den CD44-positiven Gefäßen zeigen sich sowohl Frühstadien entzündlicher Prozesse als auch perivaskuläre Infiltrate mit CD44-positiven, in das umliegende Parenchym eingewanderte, inflammatorische Zellen (durch Pfeile in Abbildung 23 E gekennzeichnet).

Maßstab = 100µm (A, B, C, D); Maßstab 50µm (E)

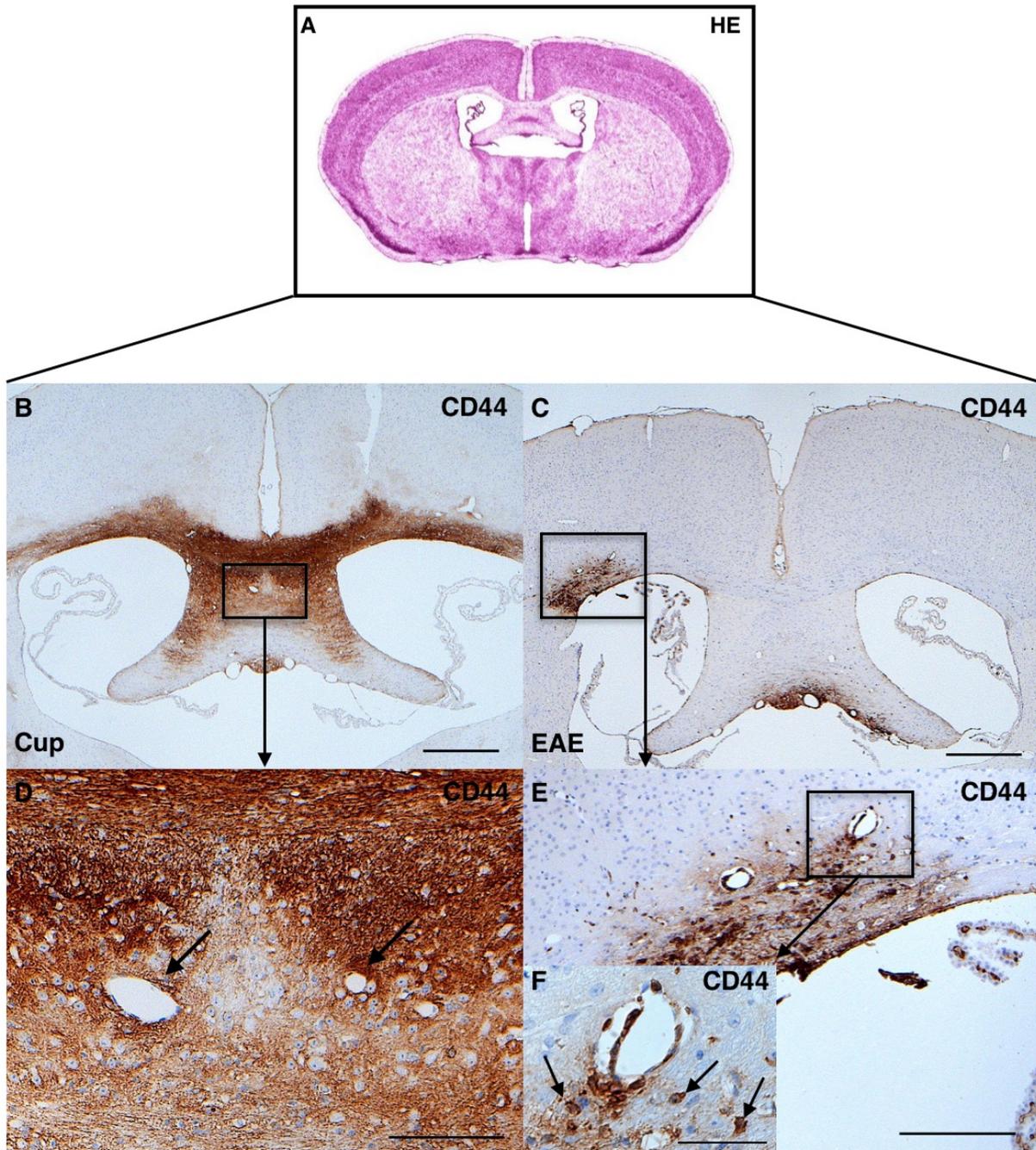


Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 in perivaskulären Regionen eines Mäusehirns nach einer 3-wöchigen Cuprizon-Intoxikation und nach einer aktiven EAE-Immunisierung im Vergleich

(A) zeigt eine HE-Färbung auf Höhe des Hippokampus (Region 235) in der Übersicht (Sidman et al., 2017). (B) zeigt eine anti-CD44 immunhistochemische Färbung nach einer 3-wöchigen Cuprizon-Intoxikation in der Übersicht. (C) zeigt die gleiche Färbung nach einer aktiven EAE-Immunisierung in der Übersicht. (D) zeigt CD44-positive Gefäße im Hippokampus nach einer 3-wöchigen Cuprizon-Intoxikation (E) zeigt eine CD44-positive, fokale Läsion im Corpus callosum nach einer aktiven EAE-Immunisierung. (F) zeigt ein perivaskuläres Infiltrat mit eingewanderten, CD44-positiven, inflammatorischen Zellen in das umliegende Parenchym nach einer aktiven EAE-Immunisierung (durch Pfeile gekennzeichnet).

Somit zeigt sich, dass es sowohl nach einer Cuprizon-Intoxikation als auch nach einer aktiven EAE-Immunisierung zu einer erhöhten Expression von CD44 in perivaskulären Regionen kommt. Nach einer aktiven EAE-Immunisierung kommt es zusätzlich zur Bildung von CD44-positiven, perivaskulären Infiltraten. Hierbei wandern CD44-positiv, inflammatorische Zellen in das umliegende Parenchym ein und durchbrechen in diesem Bereich die Blut-Hirn-Schranke (durch die Pfeile gekennzeichnet).

Maßstab = 500µm (B, C); Maßstab = 100µm (D); Maßstab = 200µm (E); Maßstab = 50µm (F)

3.4 Erhöhte CD44-Expression nach direkter LPC-Injektion in das paramediane Corpus callosum

In einem letzten Schritt wurde ein weiteres Tiermodell in die Untersuchungen miteinbezogen, das LPC-Modell. Hierbei wird den Versuchstieren Lysophosphatidylcholin (LPC), ein Membrandetergens, direkt in das *paramediane Corpus callosum* injiziert.

Die stereotaktische Injektion führt im Bereich des *lateralen* und bei entsprechender Läsionsausbreitung, auch im Bereich des *medialen Corpus callosums* zur Ausbildung von demyelinisierten Herden.

Nach einer 1-wöchigen postoperativen Inkubationszeit bei normaler Haltung wurden die Versuchstiere unter Analgesie transkardial perfundiert und die Gewebeproben anschließend fixiert.

Da sich die Demyelinisierung in diesem Tiermodell primär auf das *mediale* und *laterale Corpus callosum* beschränkt, wurden diese beiden Regionen als ROI bei den Untersuchungen dieser Tiere festgelegt (Abbildung 25 **A**).

In einem ersten Schritt wurde mit Hilfe einer anti-CD44 immunhistochemischen Färbung die Expression von CD44 sowohl in der Kontrollgruppe (Abbildung 25 **B**, 25 **C**), als auch bei LPC behandelten Tieren (Abbildung 25 **D**, 25 **E**) visualisiert und anschließend miteinander verglichen.

Die Färbeintensität bei Schnitten der Kontrollgruppe war insgesamt gering. Ein leichtes anti-CD44-Signal war im Bereich des *medialen Corpus callosums*, des *Fornix* und des Ansatzes der *Fissura longitudinalis cerebri* zu erkennen (Abbildung 25 **C**). Dieses Resultat war zu erwarten und deckt sich mit Ergebnissen anderer Kontrollgruppen, welche im Rahmen dieser Studie hinsichtlich einer anti-CD44-Immunreaktivität in diesen Bereichen untersucht wurden.

In einem nächsten Schritt untersuchten wir, ob es im Bereich des *medialen* und *lateralen Corpus callosums* nach LPC-induzierter Demyelinisierung zu einer erhöhten Expression von CD44 im Vergleich zur Kontrollgruppe gekommen ist. Wie in den Abbildungen 25 **D** und 25 **E** dargestellt kann man eine deutlich erhöhte anti-CD44-Immunreaktivität im Bereich des *medialen* und *lateralen Corpus callosums* sowie im Bereich des *Alveus* des Hippokampus und seiner *Fimbrien* Region feststellen. Diese gesteigerte CD44-Immunreaktivität deckt sich mit dem Muster der Demyelinisierung in diesem Tiermodell (nicht gezeigt). Das immunhistochemische Färbemuster der CD44-positiven Bereiche stellt sich in allen Regionen als diffuse, nicht an bestimmte zelluläre Strukturen gebundene, bräunliche Färbung dar.

Zusammenfassen konnten wir durch unsere Untersuchungen zeigen, dass es nach einer LPC-Injektion in das *paramediane Corpus callosum* der Versuchstiere im Zuge der Läsionsbildung zu einer erhöhten Expression von CD44 im Bereich des *medialen* und *lateralen Corpus*

callosums kommt. Zudem wird CD44 im Vergleich zur Kontrollgruppe auch in Anteilen des *Hippokampus* erhöht exprimiert.

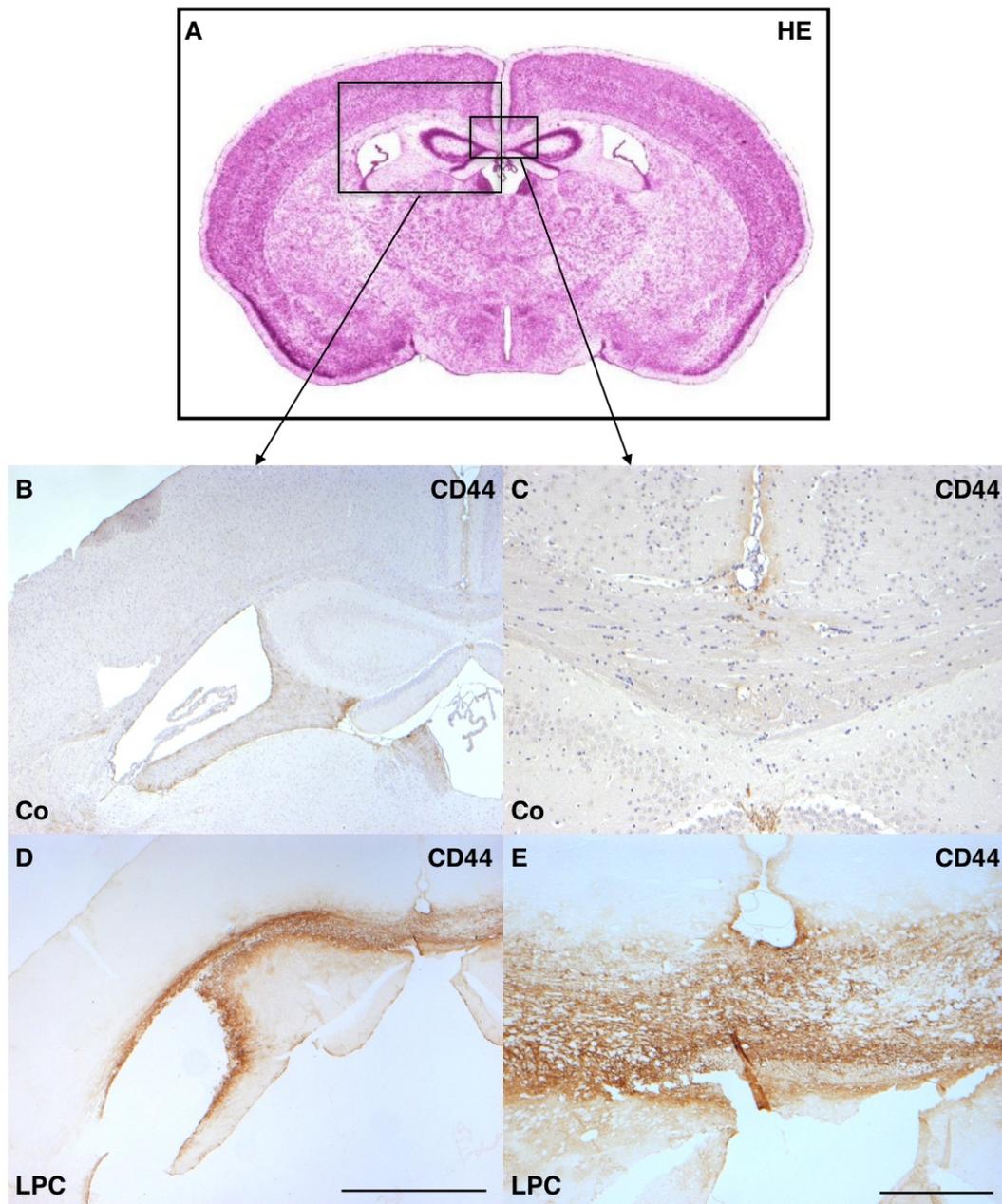


Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 im medialen und lateralen Corpus Callosum und im Hippokampus eines Mäusegehirns nach LPC-Injektion

(A) zeigt eine HE-Färbung auf Höhe des rostralen Hippokampus (Region 265) in der Übersicht (Sidman et al., 2017). (B) und (D) zeigen eine anti-CD44 immunhistochemische Färbung des lateralen Corpus callosums (LCC) bei einem Kontrolltier und nach LPC-Injektion. (C) und (E) zeigen die gleiche Färbung im Bereich des medialen Corpus callosums (mCC) bei einem Kontrolltier und nach LPC-Injektion. Die Expression von CD44 nimmt sowohl im medialen Corpus callosum (mCC), im lateralen Corpus callosum (LCC) als auch in Anteilen des Hippokampus nach LPC-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich zu.

Maßstab = 1000µm (B, D); Maßstab = 200µm (C, E)

4. Diskussion

4.1 Tiermodelle der Multiplen Sklerose und Ihre Grenzen

Die MS ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des ZNS, die auf der Wechselwirkung von zwei komplexen biologischen Systemen des menschlichen Körpers beruht, dem Immunsystem und dem ZNS (Noseworthy, Lucchinetti, Rodriguez, & Weinshenker, 2000; Ransohoff, 2012). Sie gehört in Europa zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen unter jungen Erwachsenen, deren Ätiologie aufgrund ihres heterogenen Krankheitsbildes bis heute nicht vollständig geklärt ist (Keegan & Noseworthy, 2002). Die klinischen Symptome sind sehr variabel und hängen von den betroffenen neuronalen Strukturen des ZNS ab. Diese können sich bei den Erkrankten durch motorische, sensorische, kognitive oder neurologische Ausfälle äußern (Noseworthy et al., 2000).

Trotz jahrzehntelanger Forschungsarbeit auf diesem Gebiet konnten bis heute ausschließlich Therapieansätze entwickelt werden, welche die Symptome von Patienten lindern oder das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen (Steinman & Zamvil, 2006; van der Star et al., 2012). Eine Heilung ist bisher allerdings nicht möglich.

Die MS-Forschung hat aufgrund strenger Regularien durch den Gesetzgeber nur begrenzten Zugang zu Gewebeproben und Untersuchungsmaterial von MS-Patienten. Daher ist sie auf die Verwendung von Tiermodellen angewiesen, um die Ätiologie der Erkrankung besser verstehen zu können, und neue therapeutische Ansätze zu entwickeln (Denic et al., 2011).

Aufgrund des komplexen Krankheitsbildes ist es nicht möglich, alle klinischen, radiologischen, pathologischen und genetischen Merkmale der MS in einem einzigen Tiermodell zu erfassen und zu untersuchen. Die Problematik, dass durch Tiermodelle nur Teilaspekte der MS-Pathologie untersucht werden können, wird in der Literatur häufig diskutiert, wodurch sich die Frage stellt, ob Tiermodelle wirklich für die Untersuchung einer solch komplexen Erkrankung geeignet sind (Procaccini, De Rosa, Pucino, Formisano, & Matarese, 2015).

Zudem unterscheiden sich die Tiermodelle, sowohl beim Versuchsaufbau als auch bei der Induktion der Erkrankung stark von der menschlichen MS-Ätiologie. Die Erkrankung wird in Tiermodellen vorwiegend künstlich durch eine Immunisierung (EAE Modell) oder durch ein Toxin (Cuprizon-Modell / LPC-Modell) induziert, wohingegen die auslösenden Faktoren bei der MS deutlich komplexer sind (Baxter, 2007; Keough, Jensen, & Yong, 2015; Torkildsen et al., 2008). Auch die Versuchstiere selbst können durch ihre genetische Homogenität einen Unsicherheitsfaktor darstellen, da die Tiere oft in Form einer Inzuchtlinie gezüchtet werden. Dabei können sich genetische Unregelmäßigkeiten in den Tieren manifestieren, die zu einer Verfälschung der Studienergebnisse führen könnten.

Ein weiterer wesentlicher Nachteil hinsichtlich der Verwendung von Tiermodellen ist der zeitliche Ablauf der Erkrankung. Pathologische Prozesse, die bei MS-Patienten teilweise

jahrelang vor der klinischen Manifestation der Erkrankung beginnen, jedoch unentdeckt bleiben, spielen im Tiermodell keine Rolle und können daher auch nicht berücksichtigt werden. Hier sind die Symptome innerhalb weniger Wochen oder sogar Tage nach Induktion der Erkrankung nachweisbar und klinisch messbar (Procaccini et al., 2015).

Trotz der genannten Schwachpunkte sind Tiermodelle in der heutigen MS-Forschung essentiell und zumindest bisher noch weitestgehend alternativlos. Zu den häufigsten in der Literatur beschriebenen MS-Tiermodellen gehören: (i) die experimentelle autoimmune / allergische Enzephalomyelitis (EAE); (ii) Virus-induzierte Modelle wie der Theiler-Murin-Enzephalomyelitis-Virus (TMEV) und (iii) Toxin-induzierte Modelle, wie das Cuprizon-Modell oder das LPC-Modell (Denic et al., 2011).

Das am meisten durch Studien charakterisierte MS-Tiermodell der letzten Jahrzehnte ist das EAE-Modell, welches bei Untersuchungen im Bereich von immunvermittelten inflammatorischen Prozessen im ZNS wichtige Erkenntnisse brachte (Aharoni, 2015; Denic et al., 2011; van der Star et al., 2012). Durch EAE-basierende Studien konnten 3 zugelassene Medikamente zur Behandlung der MS entwickelt werden. Dazu zählen das Glatirameracetat, Mitoxantron und das Natalizumab, welche die Progression der Erkrankung verlangsamen und heutzutage zur Standardtherapie bei der MS gehören (Steinman & Zamvil, 2006).

Dagegen erwiesen sich aber auch zahlreiche therapeutische Ansätze, die in EAE-Studien vielversprechende Ergebnisse zeigten, entweder als ineffektiv oder in einigen Fällen sogar als schädlich für MS-Patienten. Beispielsweise führten Immuntherapien mit anti-TNF und anti-CD4 Antikörpern bei EAE-induzierten Tieren zu einem Rückgang oder zur Ausheilung der Erkrankung, wohingegen bei MS Patienten keine Veränderung oder sogar eine Verschlechterung des Zustandes die Folge war (Sriram & Steiner, 2005).

Neben dem EAE-Modell wurden auch toxische Tiermodelle, darunter das Cuprizon-Modell und das LPC-Modell, in unterschiedlichen Studien zur MS angewendet. Diese Modelle erlauben es, De- und Remyelinisierungsprozesse im ZNS bei intakter Blut-Hirn-Schranke und ohne T-Zell Beteiligung zu untersuchen (Bakker & Ludwin, 1987; Hall, 1972; Hall & Gregson, 1971).

Aufbauend auf diesen etablierten Modellen der MS-Forschung entwickelte unsere Arbeitsgruppe ein Kombinationsmodell, das Cup-EAE-Modell. Mit Hilfe dieses Modells lassen sich sowohl immunvermittelte als auch nicht-immunvermittelte Aspekte der MS-Pathologie in einem Modell untersuchen und somit die Vergleichbarkeit zu „realen“ pathologischen Vorgängen verbessern. Erste Ergebnisse zeigten eine direkte Abhängigkeit zwischen neurodegenerativen Prozessen und der Stärke der Immunreaktion, was auf die sogenannte „inside-out“-Theorie bei der Entstehung der MS hindeutet (Scheld et al., 2016).

Keines der oben genannten Tiermodelle kann dem anderen gegenüber als überlegen angesehen werden, vielmehr ergänzen sie sich gegenseitig. Deshalb ist für die Wahl des richtigen Tiermodells die Fragestellung der Studie entscheidend.

Das ideale Modell zur Untersuchung der MS gibt es bis heute nicht. Dennoch können mit ihrer Hilfe bestimmte Teilaspekte der MS untersucht werden. Trotz ihrer Einschränkungen geben Tiermodelle der MS-Forschung die Möglichkeit neuartige Therapiemethoden zu entwickeln, und die Krankheit mit ihrer komplexen Ätiologie besser zu verstehen.

4.2 Ist CD44 mehr als nur ein Hyaluronsäurerezeptor?

CD44 wurde erstmals 1980 mit Hilfe des monoklonalen AK F10-89-4 auf hämatopoetischen Zellen wie Lymphozyten, Monozyten, Thymozyten und Granulozyten nachgewiesen und galt lange Zeit als „einfacher“ Bestandteil der extrazellulären Matrix ohne besondere Aufgaben (Dalchau et al., 1980; S. T. Jalkanen, Bargatze, Herron, & Butcher, 1986).

Heutzutage wird CD44 nicht mehr nur als „einfacher“ Hyaluronsäurerezeptor angesehen, sondern gilt als multifunktionelles und -strukturelles Glykoprotein, das an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt ist und ubiquitär auf nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers wie Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten oder Leukozyten exprimiert wird (Ponta et al., 2003; Sherman, Sleeman, Herrlich, & Ponta, 1994). CD44 ist an wichtigen Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen wie der Proliferation, Adhäsion und Migration beteiligt und übernimmt darüber hinaus bei zentralen physiologischen Prozessen des menschlichen Körpers wie der Hämatopoese, Lymphozytenaktivierung, Paravasation, Homing, Myelopoese, Lymphopoese, Angiogenese und der Freisetzung von Zytokinen wichtige regulatorische Funktionen (Naor et al., 1997; Sneath & Mangham, 1998). Diese Multifunktionalität des Proteins bei zellulären Prozessen ist zum einen auf die Expression von CD44-Isotyp-Varianten (CD44v) zurückzuführen, die durch posttranslationale Modifikationen wie dem alternativen Spleißen oder der N- und O-Glykosylierung entstehen. Zum anderen besitzt das Protein die Fähigkeit neben der HS auch eine Vielzahl weiterer Liganden, wie extrazelluläre Matrixglykoproteine (EZM), Zytokine (Zy), Matrix-Metalloproteasen (MMP), Osteopontin und Wachstumsfaktoren (WF), zu binden (Dzwonek & Wilczynski, 2015; Naor et al., 1997; Ponta et al., 2003; Senbanjo & Chellaiah, 2017).

Die HS gehört zur Gruppe der Glykosaminoglykanen und ist ein hochmolekularer Polymer aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten (D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin). Dieser kann je nach Kettenlänge aus wenigen Oligosacchariden (niedermolekulare-HS) bestehen oder ein Molekulargewicht von bis zu 6000 kDa (hochmolekulare-HS) erreichen. Dieser Größenunterschied ist entscheidend für die Funktion des jeweiligen HS-Moleküls, denn je nach Molekulargewicht werden entweder nur Einzelne oder aber bei hochmolekularen HS-Molekülen eine Vielzahl von HS-Rezeptoren gleichzeitig stimuliert, was unterschiedliche

Auswirkungen auf die Signaltransduktion der verschiedenen Zelltypen hat (Fraser, Laurent, & Laurent, 1997; Jordan, Racine, Hennig, & Lokeshwar, 2015).

Neben den oben beschriebenen physiologischen Funktionen gewinnt CD44 auch im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen immer mehr an Bedeutung und rückt in den Fokus aktueller Studien bei tumorösen oder inflammatorischen Erkrankungen. Das liegt unter anderem daran, dass die Beteiligung an wichtigen zellulären Prozessen wie der Adhäsion, Migration und Proliferation bei vielen Krankheitsbildern eine entscheidende Rolle in deren Pathogenese spielt und könnte somit bei der Aufklärung der pathologischen Prozesse von größerer Bedeutung sein, als man bisher angenommen hat.

Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass CD44 bei zahlreichen Erkrankungen wie der rheumatoide Arthritis, Colitis ulcerosa, entzündlichen Gefäßerkrankungen, Krebs, interstitiellen Lungenerkrankung und viralen bzw. bakteriellen Infektionen involviert ist und wichtige regulatorische Funktionen übernimmt (Ghazi-Visser et al., 2013; Jordan et al., 2015; Mikecz et al., 1999).

Studien im Bereich der Tumorforschung gaben Hinweise auf eine Beteiligung von CD44 und seiner Isotyp-Varianten bei der Progression menschlicher Tumore und konnten nachweisen, dass diese in Krebszellen unterschiedlicher Tumorarten erhöht exprimiert werden (Gunthert et al., 1995; Wang, Wong, de Heer, Xia, & Bourguignon, 2009). Beispielsweise zeigte sich eine erhöhte Expression von CD44v8-10 bei Pankreaskarzinomen (Rall & Rustgi, 1995) und von CD44v6 bei Kolonkarzinomen (Yamane, Tsujitani, Makino, Maeta, & Kaibara, 1999). CD44v6 dient in diesem Zusammenhang auch als nützlicher Tumormarker für die Tumourprogression bei Patienten mit Darm- und Brustkrebs (Kaufmann et al., 1995; Yamane et al., 1999) und stellt so ein wichtiges prognostisches Hilfsmittel in der Tumordiagnostik dar.

Aktuelle Untersuchungen auf diesem Gebiet beschäftigten sich neben CD44 auch mit seinem Hauptliganden, der HS, und dessen möglichen Einfluss auf die Tumorgenese bzw. Tumourprogression (Karousou et al., 2017).

CD44 ist aber auch an inflammatorischen Prozessen des menschlichen Körpers beteiligt und spielt bei entzündlichen Gefäßerkrankungen wie der Arteriosklerose eine wichtige Rolle.

Die Arteriosklerose ist einer der häufigsten Auslöser für akute koronare Syndrome und Schlaganfälle und gehört damit zur Gruppe der Erkrankungen mit erhöhter Mortalitätsrate. Bekannt ist, dass CD44 sowohl auf entzündlichen als auch in vaskulären Zellen exprimiert wird und bei der Adhäsion von T-Lymphozyten an das Endothel (Heather C DeGrendele, Estess, Picker, & Siegelman, 1996; H. C. DeGrendele, Estess, & Siegelman, 1997) und an glatte Muskelzellen (Lazaar et al., 1994) involviert ist. Auch bei der Freisetzung von entzündlichen Mediatoren aus Makrophagen (Hodge-Dufour et al., 1997; McKee et al., 1997; McKee et al., 1996) und T-Lymphozyten (Galandrini et al., 1993; Guo et al., 1996; Huet et al., 1989) und der

Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (Jain et al., 1996) übernimmt CD44 wichtige regulatorische Funktionen.

Weiterführende Studien zeigten, dass HS als Hauptligand des CD44-Proteins nachweislich in arteriosklerotischen Läsionen akkumuliert und die pro-inflammatorische, niedermolekulare Form der HS, die Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 stimuliert (Cuff et al., 2001; Evanko, Raines, Ross, Gold, & Wight, 1998; Merat, Fruebis, Sutphin, Silvestre, & Reaven, 2000; Riessen, Wight, Pastore, Henley, & Isner, 1996).

Des Weiteren zeigten Untersuchungen bei CD44 Knockout-Mäusen eine Reduktion von arteriosklerotischen Läsionen im Bereich der Aorta um 50-70% und bestätigten auch hier eine Akkumulation der HS in läSIONsnahen Bereichen (Cuff et al., 2001). Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass CD44 in der Pathogenese der Arteriosklerose entscheidende Funktionen, speziell bei der Progression der Erkrankung, übernimmt.

Auch bei entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis spielt CD44 eine wichtige Rolle (Ghazi-Visser et al., 2013; Mikecz et al., 1999). Studien konnten bei Arthritis-Patienten sowohl in der Synovialflüssigkeit als auch im Bereich der Synovialis eine erhöhte Expression von CD44 nachweisen. Diese ist zum einen durch die Migration von CD44-positiven Immunzellen und zum anderen durch eine erhöhte CD44-Expression durch Synovialzellen, Fibroblasten und Endothelzellen begründet (Haynes, Hale, Patton, Martin, & McCallum, 1991).

Wie bei der Arteriosklerose zeigt sich auch bei der rheumatoiden Arthritis neben der erhöhten CD44-Expression eine erhöhte Akkumulation von HS in den inflammatorischen Regionen. Bisherige Studien an Mäusen konnten zeigen, dass CD44 eine entscheidende Rolle bei der Migration von Leukozyten in das extravaskuläre Kompartiment des Gelenks spielt, und dass eine anti-CD44-AK Therapie zu einer verminderten Schwellung und Entzündung der Gelenke führt (Mikecz, Brennan, Kim, & Glant, 1995).

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen liegt die Vermutung nahe, dass CD44 auch bei neuroinflammatorischen Erkrankungen, wie der MS, eine wichtige Rolle spielen könnte.

4.3 Die Rolle von CD44 bei inflammatorischen Prozessen des ZNS und neurodegenerativen Erkrankungen

Die Entzündungsreaktion ist die erste Antwort des menschlichen Körpers auf schädliche Reize wie Infektionen oder Traumata. Die akute Entzündungsreaktion zeichnet sich primär durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und die Rekrutierung von Immunzellen in das umliegende Gewebe aus. Obwohl Entzündungsreaktionen vorübergehende Gewebeschäden verursachen können, sind sie in

der Regel selbstlimitierend. Bei Autoimmunerkrankungen kann es hingegen zu einer chronischen Reaktion kommen, bei der sich immer mehr aktivierte Immunzellen extravaskulär anreichern und eine destruktive Wirkung auf das betroffene Gewebe ausüben (Gee, Kryworuchko, & Kumar, 2004).

Die Rolle des Adhäsionsmoleküls CD44 bei Immunreaktionen wurde erstmals durch Untersuchungen mit monoklonalen CD44-AK bei Wildtyp Mäusen untersucht. Hierbei blockierten (KM201) oder verbesserten (IRAWB14) spezifische CD44-AK die HS-CD44-Interaktionen. Der AK IM7 wiederum führte zur Ablösung von CD44-Molekülen von der Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten und bewirkte dadurch die Entleerung dieser Immunzellen. Dies weist darauf hin, dass monoklonale CD44-AK nicht nur die HS-CD44-Interaktionen blockieren, sondern auch HS-unabhängige Funktionen, wie Interaktionen von CD44 und E- oder L-Selektin, beeinflussen können (Naor et al., 1997; Pure & Cuff, 2001; Ruffell, 2008; Siegelman, DeGrendele, & Estess, 1999). Diese Ergebnisse sprechen alle für eine pro-inflammatorische Funktion von CD44 bei immunologischen Prozessen (H. C. DeGrendele et al., 1997; Nedvetzki et al., 2004).

Andere Studien konnten zeigen, dass nicht nur Selektine, sondern auch T-Zell eigene CD44 Rezeptoren das „Rolling“ von Leukozyten bei inflammatorischen Prozessen in Blutgefäßen fördern (Clark, Alon, & Springer, 1996; Heather C DeGrendele et al., 1996). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch CD44-HS Interaktionen erleichtert wird (Hutás et al., 2008; Khan et al., 2004; McDonald et al., 2008).

Durch die Untersuchung zahlreicher entzündlicher Erkrankungen konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibierung des CD44-Rezeptors durch anti-CD44-AK bei inflammatorischen Autoimmunkrankheiten wie der Colitis ulcerosa oder der rheumatoiden Arthritis (Ghazi-Visser et al., 2013; Mikecz et al., 1999; Zeidler et al., 1995), aber auch bei Kontaktallergien der Haut (Camp, Scheynius, Johansson, & Purè, 1993) und dem Interleukin-2 vermittelten Vascular-Leak-Syndrom (VLS) (Rafi-Janajreh et al., 1999) zu einer geringeren Ausprägung der krankheitsspezifischen Symptome führen und somit die These der pro-inflammatorischen Funktion von CD44 in immunologischen Prozessen unterstützen.

Im Gegensatz zu anderen Regionen des menschlichen Körpers, in denen CD44 ubiquitär auf Leukozyten und Parenchymzellen, einschließlich Endothelzellen, Epithelzellen und Zellen der glatten Muskulatur exprimiert wird (Budd et al., 1987; Foster et al., 1998), ist die Expression im ZNS auf die weiße Substanz beschränkt. CD44 wird hier durch Gliazellen, vorwiegend Astrozyten und Oligodendrozyten, exprimiert und dient sowohl bei Mäusen als auch in humanem Gewebe als Marker für astrozytäre Vorläuferzellen (Girgrah et al., 1991; Liu et al., 2004; McKenzie et al., 1982; Moretto et al., 1993; Naruse et al., 2013; Vogel, Butcher, & Picker, 1992)

Erste Studien zeigten, dass MS-Patienten vergleichend zum gesunden Menschen, sowohl eine erhöhte Konzentration an HS als auch eine erhöhte Expression von CD44 in der weißen Substanz, vorwiegend in läsionsnahen Regionen aufweisen und T-Zellen während eines MS-Schubes CD44 erhöht exprimieren (Back et al., 2005; Girgrah et al., 1991; Soilu-Hanninen, Laaksonen, & Hanninen, 2005). Ganz ähnliche Befunde lassen sich auch bei EAE behandelten Tieren beobachten (Back et al., 2005).

Transgene Tiere zeigten bei einer durch einen genetischen Promoter (CNPase) regulierten Überexpression von CD44 eine weit verbreitete, progressive Demyelinisierung im gesamten ZNS unter Abwesenheit einer entzündlichen Reaktion (Tuohy et al., 2004), was darauf schließen lässt, dass durch Oligodendrozyten oder Schwann'sche Zellen exprimierte CD44-Proteine eine Rolle in Demyelinisierungsprozessen des ZNS spielen.

Darüber hinaus konnten immunhistochemische Studien zeigen, dass sich HS in demyelinisierten Läsionen von Patienten mit MS und EAE behandelten Mäusen anreichert, was zumindest teilweise auf eine erhöhte Expression von CD44 durch Astrozyten zurückzuführen ist (Back et al., 2005).

Aktiviert Astrozyten weisen im Bereich von demyelinisierten Läsionen eine erhöhte Expression von CD44 auf, was auf eine Beteiligung dieses Proteins bei der Astrogliose hindeutet (Girgrah et al., 1991; Haegel, Tolg, Hofmann, & Ceredig, 1993).

Bei der MS treten Wechselwirkungen zwischen Astrozyten und Lymphozyten während der Immunzellrekrutierung in das ZNS im Bereich von inflammatorischen Läsionen auf. Studien zeigten, dass CD44 direkt an diesen Wechselwirkungen (Haegel et al., 1993) und an der trans-epithelialen Migration von Leukozyten im ZNS beteiligt ist (Brennan et al., 1999; Johnson & Ruffell, 2009). Die Leukozytenmigration in das umliegende Gewebe wird zusätzlich durch die Bindung des Hauptliganden HS an CD44 reguliert (Winkler et al., 2012).

Diese Ergebnisse werden durch weiterführende Studien mit neuronalen Vorläuferzellen und transplantierten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen bestätigt. Hierbei zeigten AK-Untersuchungen, dass CD44 auch hier zentrale regulatorische Funktionen bei der Rekrutierung und der trans-epithelialen Migration dieser Zellen übernimmt, was für eine pro-inflammatorische Rolle von CD44 spricht (Piao, Wang, & Duncan, 2013; Rampon et al., 2008). Studien mit EAE behandelten CD44 Knockout-Mäusen lieferten jedoch kontroverse Ergebnisse in Hinblick auf die Rolle von CD44 bei inflammatorischen Prozessen.

Hierbei zeigten Untersuchungen, dass CD44 einen ausgeprägten Einfluss auf die Differenzierung von Th1, Th2, Th17 sowie regulatorischer T-Zellen hat, und hierbei die Ablation von CD44 die Th2-Differenzierung fördert und gleichzeitig die pro-inflammatorische Th1 und Th17 – Differenzierung hemmt, woraus eine Verbesserung der EAE-Symptomatik der betroffenen Tiere resultiert (Guan, Nagarkatti, & Nagarkatti, 2011).

Weiterführende Untersuchungen zeigten hier, dass speziell die Ablation der spezifischen Isotypen CD44v7 und CD44v10 zu deutlich schwächeren Krankheitssymptomen und einer geringeren Anzahl an inflammatorischen Infiltraten nach einer EAE-Behandlung führt. Besonders der Mangel an CD44v10 spielt hier eine entscheidende Rolle, denn dieser bewirkt nachweislich eine deutlich geringere Th1-Immunantwort, wodurch auch hier die antiinflammatorische Wirkung von CD44 gezeigt werden kann (Ghazi-Visser et al., 2013).

Kontroverse Studien in diesem Bereich zeigten hingegen bei der Ablation von CD44 neben stärkeren Symptomen der EAE behandelten Tiere und einer erhöhten Anzahl entzündlicher T-Zellen auch eine vermehrte Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine bei gleichzeitig erhöhter Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke, verglichen mit Mäusen des Wildtyps (Flynn, Michaud, & Madri, 2013).

Diese kontroverse Datenlage gibt Hinweise darauf, dass die verschiedenen CD44-Isotyp-Varianten unterschiedliche Funktionen im Rahmen entzündlicher Prozesse des ZNS übernehmen könnten, und dass CD44 neben der pro-inflammatorischen Funktion auch eine antiinflammatorische Wirkung auf entzündliche Vorgänge haben kann. Hierbei beeinflusst es vor allem die Prozesse der T-Zell-Differenzierung, die trans-epitheliale Migration von Entzündungszellen und die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (Dzwonek & Wilczynski, 2015; Flynn et al., 2013; Ghazi-Visser et al., 2013).

Aktuelle Studien auf diesem Gebiet zeigen, dass die Beeinträchtigung der EAE Symptomatik durch CD44 auch auf eine Dysbiose der Darmflora zurückzuführen ist und der Phänotyp von CD44 Knockout-Mäusen durch die Veränderung der Darmflora beeinflusst werden kann (Chitralla et al., 2017).

Nicht nur bei der MS, sondern auch bei anderen neurologischen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson, scheint CD44 an pathologischen Prozessen beteiligt zu sein.

Alzheimer-Patienten zeigten sowohl eine erhöhte Expression von CD44s als auch von spezifischen Isotyp-Varianten des Proteins (CD44v3, CD44v6, CD44v10) in Regionen des Hippocampus und in Leukozyten. Immunhistochemische Untersuchungen ergaben, dass CD44s primär durch Astrozyten, die Isotyp-Varianten vorwiegend neuronal exprimiert werden. AK-Studien konnten eine Beteiligung von CD44v10 am neuronalen Zelltod bei Alzheimer-Patienten nachweisen, was zum einen darauf hindeutet, dass bestimmte CD44-Isotypen zum Krankheitsbild von Alzheimer beitragen und zum anderen, dass die Hemmung von CD44v10 als protektive Therapiemethode der Erkrankung dienen könnte (Pinner et al., 2017; Uberti et al., 2010).

Studien bei Parkinson-Patienten konnten außerdem eine Beteiligung von CD44 an wesentlichen Prozessen der Erkrankung bestätigen. CD44 ist an der trans-epithelialen Migration von Mikrogliazellen mit Hilfe des Proteins α -Synuclein in die *Substantia nigra pars*

compacta beteiligt und übernimmt auch bei diesem Krankheitsbild eine entscheidende Funktion (Kim et al., 2009).

Ziel dieser Arbeit war es, aufbauend auf den oben genannten Daten, die Funktion von CD44 im Rahmen von neuroinflammatorischen Prozessen besser verstehen zu können.

Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen untersuchten wir die Expression von CD44 in unterschiedlichen experimentellen Tiermodellen der MS-Forschung (Cuprizon-Modell, EAE-Modell, Cup-EAE-Modell, LPC-Modell) und verglichen die Ergebnisse mit den Werten der Kontrollgruppe.

Eine bereits veröffentlichte Studie unserer Arbeitsgruppe konnte anhand einer Gene-Array Analyse zeigen, dass CD44 bei einer Cuprizon-induzierten Demyelinisierung erhöht exprimiert wird (Krauspe et al., 2015). Diese Ergebnisse konnten wir auch mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen und einer densitometrischen Messung bestätigen. Hier zeigte sich, dass eine Cuprizon-induzierte Demyelinisierung von einer gesteigerten CD44-Expression begleitet wird und diese vor allem in Bereichen der weißen Substanz zu finden war. Die kortikale Demyelinisierung wurde hingegen nur teilweise, und vor allem in tieferen Schichten, von einer CD44-Induktion begleitet. Bekannt ist, dass im Cuprizon-Modell der Demyelinisierungsprozess nach 3-5 Wochen sein Maximum erreicht, was mit unserer densitometrischen Messung der CD44-Expression positiv korreliert (M. Kipp et al., 2009)

Des Weiteren zeigten Studien, dass CD44 im ZNS durch Gliazellen, vorwiegend Astrozyten und Oligodendrozyten, exprimiert wird und als Marker für astrozytäre Vorläuferzellen dient (Girgah et al., 1991; Liu et al., 2004; McKenzie et al., 1982; Moretto et al., 1993; Naruse et al., 2013; Vogel et al., 1992). Da es im Cuprizon-Modell nachweislich neben einer Oligodendrozytenapoptose und Mikrogliaaktivierung auch zu einer Astroglie in den demyelinisierten Regionen kommt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier vorwiegend um eine astrozytäre CD44-Expression handelt (Hiremath et al., 1998).

Somit konnten wir mit unseren Untersuchungen zeigen, dass es auch bei nicht-autoimmunvermittelten Demyelinisierungsprozessen ohne T-Zell Beteiligung zu einer erhöhten Expression von CD44 kommt. Ganz ähnliche Befunde ergaben sich auch bei Studien mit transgenen Tieren, in denen es durch die erhöhte Expression von CD44 zu progressiven Demyelinisierungsprozessen unter Abwesenheit einer entzündlichen Reaktion im gesamten ZNS gekommen ist (Tuohy et al., 2004). Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass CD44 auch unabhängig von immunologischen Vorgängen an Demyelinisierungsprozessen im ZNS beteiligt ist.

Untersuchungen am EAE-Modell konnten bisher zeigen, dass CD44 sowohl an adhäsiven Wechselwirkungen zwischen T-Zellen und Astrozyten beteiligt ist, als auch an der Migration von Lymphozyten in entzündliche Läsionen des ZNS, was durch den Hauptliganden, die HS,

gefördert wird (Brennan et al., 1999; Haegel et al., 1993; Winkler et al., 2012). HS akkumuliert nachweislich sowohl in akuten (14 Tage nach der Immunisierung) als auch in chronischen (30 Tage nach der Immunisierung) Läsionen von EAE behandelten Tieren und korreliert positiv mit der Expression von CD44 in diesen Bereichen. Hierbei exprimieren T-Zellen und Mikroglia niedermolekulare HS-Moleküle in akuten Läsionen des ZNS, wohingegen in chronischen Läsionen die hochmolekularen HS-Moleküle vorwiegend durch Astrozyten exprimiert werden (Back et al., 2005). Dieser Größenunterschied ist entscheidend, denn je nach Molekulargewicht kann es verschiedene Auswirkungen auf die Signaltransduktion der unterschiedlichen Zellen haben (Fraser et al., 1997; Jordan et al., 2015).

Dies könnte eine wichtige Rolle bei der Frage spielen, ob CD44 eher in pro- oder antiinflammatorische Prozesse involviert ist, denn dieser Punkt wird in der Literatur aktuell kontrovers diskutiert. Es ist noch nicht ganz klar welche Funktion CD44 bei inflammatorischen Prozessen im ZNS wirklich einnimmt, aber neben der Größe des Hauptliganden ist es auch denkbar, dass CD44 aufgrund seiner vielen Isotyp-Varianten Entzündungsreaktionen unterschiedlich beeinflussen kann und letztendlich zu einem anderen Krankheitsverlauf führt. Dies sind Ansätze, welche in weiterführenden Studien konkretisiert werden müssen.

Ähnliche Ergebnisse wie im Cuprizone-Modell zeigten sich bei unseren Untersuchungen auch bei den immunhistochemisch aufbereiteten Schnitten des Rückenmarks von EAE behandelten Tieren. Auch hier konnten wir zeigen, dass CD44 verstärkt in der weißen Substanz exprimiert wird und dass das retikuläre / filiforme Färbemuster auch hier am ehesten für eine astrozytäre Expression spricht. Insgesamt zeigten die EAE behandelten Tiere, vergleichend zur Kontrollgruppe, eine erhöhte CD44-Expression in den CD44-positiven Bereichen und wiesen vor allem bei den hämatopoetischen Zellen sowohl im Zytoplasma als auch auf der Zellmembran eine erhöhte CD44-Positivität auf.

In einem nächsten Schritt beschäftigten wir uns mit dem von unserer Arbeitsgruppe entwickelten Kombinationsmodell (Cup-EAE-Modell), untersuchten perivaskuläre Bereiche der behandelten Tiere, und verglichen die Ergebnisse mit anderen Tiermodellen (Cuprizone-Modell, EAE-Modell, Cuprizone + PTX-Modell). Im Cup-EAE-Modell ließen sich sowohl CD44-positive als auch CD44-negative Gefäße nachweisen. CD44-positive Gefäße waren vorwiegend im Bereich des mCC, der *Fimbria hippocampi* und dem *Corpus striatum* lokalisiert und durch CD44-positive Zellen im Virchow-Robin-Raum und perivaskuläre Infiltrate gekennzeichnet. Diese Ergebnisse geben Hinweise für eine Beteiligung von CD44 bei der trans-epithelialen Migration der Entzündungszellen in diesen Regionen. Viele Studien beschäftigten sich mit der Rolle von CD44 bei Migrationsprozessen unterschiedlicher Zelltypen, bei denen CD44 wichtige regulatorische Funktionen zugesprochen wurden (Brennan et al., 1999; Johnson & Ruffell, 2009; Piao et al., 2013; Rampon et al., 2008; Winkler et al., 2012). Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den ins Parenchym

eingewanderten Zellen um CD44-positive Immunzellen bzw. T-Lymphozyten handelt, welche mit Hilfe des CD44 Adhäsionsmoleküls die Blut-Hirn-Schranke überwinden konnten. Studien zeigten auch bei MS Patienten, dass extravaskuläre T-Zellen während eines MS-Schubes CD44 erhöht exprimieren (Soilu-Hanninen et al., 2005).

Vergleichend zu den Ergebnissen der Cup-EAE behandelten Tiere, zeigten sich nach einer 3-wöchigen Cuprizin-Intoxikation hingegen nur Gefäße CD44-positiv, die entweder in Cuprizin-vulnerablen Regionen lagen oder aber auch bei Kontrolltieren bereits positiv waren. Gefäße ausserhalb dieser Bereiche zeigten sich CD44-negativ.

Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch nach einer Kombinationsbehandlung aus Cuprizin in Verbindung mit PTX.

Im letzten Teil unserer Studie untersuchten wir die CD44-Expression nach einer LPC-Injektion in das paramediane *Corpus callosum*. Wir konnten auch hier eine deutlich erhöhte Expression von CD44 im Bereich des mCC und LCC sowie in Anteilen des Hippokampus vergleichend zur Kontrollgruppe nachweisen, die sich mit dem Muster der Demyelinisierung in diesem Tiermodell deckt. Obwohl auch im LPC-Modell der Demyelinisierungsprozess nicht-autoimmunvermittelt, und somit bei intakter Blut-Hirn-Schranke und ohne T-Zell Beteiligung abläuft, weisen die demyelinisierten Regionen eine erhöhte CD44-Expression auf. Das bestärkt die Annahme, dass CD44 auch unabhängig von immunologischen Prozessen wichtige regulatorische Funktionen bei Demyelinisierungsprozessen im ZNS übernimmt und die Expression von CD44 durch Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten) bei diesem Prozess entscheidender ist als bisher angenommen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es in demyelinisierten Regionen des ZNS neben der Mikrogliaaktivierung auch zu einer erhöhten Expression von CD44 kommt. Nur vereinzelt konnten bei Kontrolltieren CD44-positive astrozytäre Strukturen im *Corpus callosum* identifiziert werden. Unsere Untersuchungen geben Hinweise auf eine Beteiligung von CD44 an der trans-epithelialen Migration von Immunzellen bei Entzündungsprozessen und bei neuroinflammatorischen Erkrankungen des ZNS. Zudem konnten wir nachweisen, dass es sowohl in immunvermittelten (EAE-Modell / Cup-EAE-Modell) als auch in nicht-immunvermittelten (Cuprizin-Modell / LPC-Modell) Tiermodellen zu einer erhöhten Expression von CD44 in demyelinisierten Regionen kommt. Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung von CD44 an Demyelinisierungsprozessen im ZNS hin, welche jedoch unabhängig von einer Immunreaktion sind.

Wichtige Fragen zur Funktion und Beteiligung von CD44 bei inflammatorischen Prozessen müssen jedoch noch durch weiterführende Studien geklärt werden. Untersuchungen bei Tiermodellen, in denen CD44-HS Interaktionen gehemmt werden, sowie Studien mit CD44 Knockout-Mäusen könnten wichtige neue Einblicke in die Rolle von CD44 *in vivo* liefern und

die notwendigen Modelle zur Untersuchung der Wirkungsmechanismen von CD44 auf zellulärer und molekularer Ebene hervorbringen. Nur wenn wir alle Funktionen von CD44 im gesamten Organismus erfasst haben und verstehen, ist es uns möglich Rückschlüsse auf seine Rolle bei Entzündungsprozessen und anderen pathologischen Vorgängen zu ziehen. CD44 könnte ein wichtiger Ansatzpunkt neuartiger Behandlungsmethoden von entzündlichen Erkrankungen sein, die sich in Kombination mit anderen Therapieansätzen als besonders wirksam erweisen könnten.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Stimuli definiert, welche die Expression und Aktivierung von CD44 induzieren. Die Signalwege, welche die Expression von CD44 regulieren, aber auch die biochemischen Grundlagen für den Übergang vom nieder- zum hochaffinen Zustand für HS des Rezeptors sind vielfältig und hängen vom Zelltyp und Reiz ab. Basierend auf den bei Mäusen erzielten Ergebnissen könnte die Hemmung spezifischer CD44-Isotyp-Varianten und die Bindung an ihre Liganden auch eine plausible Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiemethoden sein.

Obwohl AK-Therapien bisher nur in sehr begrenzter Anzahl erfolgreich eingesetzt wurden, werden kleine Molekülinhibitoren, die entweder den Rezeptor oder die Ligandenbindungsstellen des CD44-Proteins besetzen, weiterverfolgt (Mummert, Mohamadzadeh, Mummert, Mizumoto, & Takashima, 2000) und könnten einen praktikableren Ansatz für die langfristige Behandlung chronischer Entzündungskrankheiten bieten.

Obwohl Human-Studien mit CD44 noch nicht durchführbar sind, dürften weitere klinische Untersuchungen, welche die Beziehung zwischen der Expression von CD44 und seiner Funktion bei Entzündungsprozessen untersuchen, eine Grundlage für die Erprobung von Therapeutika liefern, die gezielt in Funktionen von CD44 eingreifen und den Krankheitsverlauf dadurch beeinflussen.

5. Zusammenfassung

Bei der Multiplen Sklerose, kurz MS, handelt es sich um eine sehr häufige Erkrankung, welche vor allem im jungen Erwachsenenalter auftritt. Histopathologisch ist die MS durch verstreute, entzündliche Herde innerhalb des Zentralnervensystems gekennzeichnet. Welche Faktoren zum Ausbruch der Erkrankung, und somit zu den entzündlichen Herden führen, ist nicht bekannt. Um die zu Grunde liegenden pathophysiologischen Zusammenhänge der MS besser verstehen zu können, bedient man sich in der MS-Forschung unterschiedlicher experimenteller Tiermodelle, welche bestimmte Teilaspekte der Erkrankung rekapitulieren. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit untersuchte ich die Expression des Oberflächenproteins CD44.

CD44 wird ubiquitär auf nahezu allen Körperzellen, im Gehirn vorwiegend von Astrozyten und Oligodendrozyten, exprimiert. CD44 scheint bei ganz verschiedenen Pathologien, wie etwa der Tumorausbreitung, eine wichtige Rolle zu spielen. Inwieweit CD44 im Rahmen der MS-Pathologie und Pathogenese eine Rolle spielt ist unzureichend untersucht.

Bereits durch unsere Arbeitsgruppe veröffentlichte Ergebnisse auf diesem Gebiet geben Hinweise auf eine Beteiligung von CD44 bei inflammatorischen Prozessen im ZNS. Durch Gene-Array Analysen konnten wir eine erhöhte CD44 mRNA-Expression im Rahmen einer Cuprizon-induzierten Demyelinisierung nachweisen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Funktion von CD44 im Rahmen der MS-Pathologie besser verstehen zu können und die Expression in unterschiedlichen murinen Multiple Sklerose Tiermodellen zu analysieren.

Hierfür wurden Gewebeproben von Versuchstieren unterschiedlicher MS-Tiermodelle immunhistochemisch aufgearbeitet und in Hinblick auf die CD44-Expression untersucht. Wir bedienten uns bei unseren Untersuchungen sowohl toxischen Tiermodellen (Cuprizon-Modell und LPC-Modell) als auch Tiermodellen, welche auf einer aktiven Immunisierung der Versuchstiere beruhen (EAE-Modell und Cup-EAE-Modell).

Insgesamt konnten wir durch unsere Untersuchungen zeigen, dass es in demyelinisierten Regionen des ZNS neben einer Mikrogliaaktivierung auch zu einer erhöhten Expression von CD44 kommt. Darüber hinaus zeigen unsere Ergebnisse, dass CD44 an der trans-epithelialen Migration von Immunzellen in das ZNS beteiligt sein könnte. Eine erhöhte CD44-Expression konnten wir sowohl in immunvermittelten (EAE-Modell und Cup-EAE-Modell) als auch in nicht-immunvermittelten (Cuprizon-Modell und LPC-Modell) Tiermodellen nachweisen.

Unsere Untersuchungen geben erste Hinweise auf eine Beteiligung von CD44 bei inflammatorischen und demyelinisierenden Prozessen des ZNS. Inwieweit CD44 in solche Prozesse funktionell eingreift, und welche regulatorischen Mechanismen hierbei eine Rolle spielen, müssen entsprechende funktionelle Studien zeigen.

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.....	8
Abbildung 2: Strukturformel von Bis(cyclohexanon)oxaldihydrizon (Cuprizon).....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Theorien zur Entstehung der Multiplen Sklerose.....	14
Abbildung 4: Strukturformel von Lysophosphatidylcholin (Lysolecithin).	15
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des CD44s-Proteins.	17
Abbildung 6: Exemplarische Darstellung des menschlichen CD44-Gens und mögliche Isotyp-Varianten.	18
Abbildung 7: Schematische Darstellung der verschiedenen Versuchsgruppen.....	25
Abbildung 8: Schematische Darstellung der ABC-Methode.	27
Abbildung 9: Darstellung der in der Studie analysierten Gehirnregionen im Cuprizon-Modell.	32
Abbildung 10: (A) Darstellung der individuell festgelegten ROI. (B) Grafische Darstellung der Ergebnisse der densitometrischen Messung (*p<0,05).....	34
Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 im medialen Corpus callosum (mCC) eines Mäusegehirns in der Initial- und Spätphase der Cuprizon-Intoxikation.....	37
Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 in der Spätphase der Cuprizon-Intoxikation.....	39
Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von Iba1 nach 3- 5-wöchiger (Spätphase) Cuprizon-Intoxikation	40
Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von PLP nach 3- 5-wöchiger (Spätphase) Cuprizon-Intoxikation	41
Abbildung 15: Negativ- und Positivkontrolle nach 5-wöchiger Cuprizon-Intoxikation.....	42
Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von PLP, Iba1 und CD44 in lateralen Anteilen des Corpus callosums (LCC) eines Mäusegehirns vergleichend bei Kontrolltieren und in der Spätphase der Cuprizon-Intoxikation.....	44
Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis von PLP, Iba1 und CD44 in primär somatomotorischen (pMcx) und primär somatosensorischen (pScx) Anteilen des Kortex eines Mäusegehirns vergleichend bei Kontrolltieren und in der Spätphase der Cuprizon-Intoxikation	45
Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von PLP, Iba1 und CD44 in Anteilen der Capsula interna und umgebende Regionen der weißen Substanz eines Mäusegehirns vergleichend bei Kontrolltieren und in der Spätphase der Cuprizon-Intoxikation.....	46

Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 im Rückenmark eines Kontrolltiers	49
Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 im Rückenmark einer Maus nach aktiver EAE-Immunsierung.....	50
Abbildung 21: Exemplarische Darstellung von perivaskulären Infiltraten in verschiedenen immunhistochemischen Färbungen eines Mäusegehirns	52
Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 in einem Mäusegehirn nach toxisch induzierter Demyelinisierung in Kombination mit einer aktiven EAE-Immunsierung	53
Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 in perivaskulären Bereichen eines Mäusegehirns nach toxisch induzierter Demyelinisierung in Kombination mit einer aktiven EAE-Immunsierung	54
Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 in perivaskulären Regionen eines Mäusegehirns nach einer 3-wöchigen Cuprizin-Intoxikation und nach einer aktiven EAE-Immunsierung im Vergleich.....	55
Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 im medialen und lateralen Corpus Callosum und im Hippokampus eines Mäusegehirns nach LPC-Injektion.....	57

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung verschiedener Arbeiten, die sich mit CD44 im Kontext der Multiplen Sklerose beschäftigt haben.....	20
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien bei der immunhistochemischen Färbung.....	23
Tabelle 3: Manuelle Paraffineinbettung.....	26
Tabelle 4: Entparaffinierung durch Xylol und Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe.	28
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper.....	29
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper.....	29
Tabelle 7: Dehydrierung durch aufsteigende Alkoholreihe und Vorbereitung zum Eindecken mit Xylol.....	30
Tabelle 8: Färbeprotokoll der immunhistochemischen Färbungen.	31

V. Literaturverzeichnis

- Aharoni, R. (2015). Animal Models of Multiple Sclerosis: Imperfect but Imperative. *J Mult Scler (Foster City)* 2: e106. doi: 10.4172/2376-0389.1000 e10 6 Page 2 of 2 7. Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, et al.(2003) Myelin oligodendrocyte glycoprotein specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med*, 197, 1073-1081.
- Back, S. A., Tuohy, T. M., Chen, H., Wallingford, N., Craig, A., Struve, J., . . . Sherman, L. S. (2005). Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med*, 11(9), 966-972. doi:10.1038/nm1279
- Bakker, D. A., & Ludwin, S. K. (1987). Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases. *J Neurol Sci*, 78(2), 125-137.
- Barnett, M. H., & Prineas, J. W. (2004). Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol*, 55(4), 458-468. doi:10.1002/ana.20016
- Baxi, E. G., DeBruin, J., Tosi, D. M., Grishkan, I. V., Smith, M. D., Kirby, L. A., . . . Gocke, A. R. (2015). Transfer of myelin-reactive th17 cells impairs endogenous remyelination in the central nervous system of cuprizone-fed mice. *J Neurosci*, 35(22), 8626-8639. doi:10.1523/jneurosci.3817-14.2015
- Baxter, A. G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol*, 7(11), 904-912. doi:10.1038/nri2190
- Besser, R., & Krämer, G. (2006). *Multiple Sklerose: Antworten auf die 111 häufigsten Fragen*.
- Blakemore, W. F. (1972). Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *J Neurocytol*, 1(4), 413-426.
- Blakemore, W. F., Eames, R. A., Smith, K. J., & McDonald, W. I. (1977). Remyelination in the spinal cord of the cat following intraspinal injections of lysolecithin. *J Neurol Sci*, 33(1-2), 31-43.
- Brennan, F. R., O'Neill, J. K., Allen, S. J., Butter, C., Nuki, G., & Baker, D. (1999). CD44 is involved in selective leucocyte extravasation during inflammatory central nervous system disease. *Immunology*, 98(3), 427-435.
- Budd, R. C., Cerottini, J. C., Horvath, C., Bron, C., Pedrazzini, T., Howe, R. C., & MacDonald, H. R. (1987). Distinction of virgin and memory T lymphocytes. Stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. *J Immunol*, 138(10), 3120-3129.
- Camp, R. L., Scheynius, A., Johansson, C., & Purè, E. (1993). CD44 is necessary for optimal contact allergic responses but is not required for normal leukocyte extravasation. *Journal of Experimental Medicine*, 178(2), 497-507.
- Carlton, W. W. (1966). Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone. *Toxicol Appl Pharmacol*, 8(3), 512-521.

- Carlton, W. W. (1967). Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sci*, 6(1), 11-19.
- Carlton, W. W. (1969). Spongiform encephalopathy induced in rats and guinea pigs by cuprizone. *Experimental and Molecular Pathology*, 10(3), 274-287. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0014-4800\(69\)90057-4](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4800(69)90057-4)
- Carter, W. G., & Wayner, E. A. (1988). Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J Biol Chem*, 263(9), 4193-4201.
- Chitralla, K. N., Guan, H., Singh, N. P., Busbee, B., Gandy, A., Mehrpouya-Bahrami, P., . . . Nagarkatti, M. (2017). CD44 deletion leading to attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis results from alterations in gut microbiome in mice. *Eur J Immunol*, 47(7), 1188-1199. doi:10.1002/eji.201646792
- Christen, P., Jaussi, R., & Benoit, R. (2016). *Biochemie und Molekularbiologie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten*: Springer Spektrum.
- Clark, R. A., Alon, R., & Springer, T. A. (1996). CD44 and hyaluronan-dependent rolling interactions of lymphocytes on tonsillar stroma. *J Cell Biol*, 134(4), 1075-1087.
- Colombatti, A., Hughes, E. N., Taylor, B. A., & August, J. T. (1982). Gene for a major cell surface glycoprotein of mouse macrophages and other phagocytic cells is on chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(6), 1926-1929.
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*, 164(4), 1079-1106. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x
- Cuff, C. A., Kothapalli, D., Azonobi, I., Chun, S., Zhang, Y., Belkin, R., . . . Pure, E. (2001). The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. *J Clin Invest*, 108(7), 1031-1040. doi:10.1172/jci12455
- Dalchau, R., Kirkley, J., & Fabre, J. W. (1980). Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur J Immunol*, 10(10), 737-744. doi:10.1002/eji.1830101003
- de la Torre, M., Heldin, P., & Bergh, J. (1995). Expression of the CD44 glycoprotein (lymphocyte-homing receptor) in untreated human breast cancer and its relationship to prognostic markers. *Anticancer Res*, 15(6b), 2791-2795.
- DeGrendele, H. C., Estess, P., Picker, L. J., & Siegelman, M. H. (1996). CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1119-1130.
- DeGrendele, H. C., Estess, P., & Siegelman, M. H. (1997). Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science*, 278(5338), 672-675.
- Denic, A., Johnson, A. J., Bieber, A. J., Warrington, A. E., Rodriguez, M., & Pirko, I. (2011). The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, 18(1), 21-29.
- Dzwonek, J., & Wilczynski, G. M. (2015). CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(175). doi:10.3389/fncel.2015.00175

- Evanko, S. P., Raines, E. W., Ross, R., Gold, L. I., & Wight, T. N. (1998). Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Am J Pathol*, *152*(2), 533-546.
- Fernandez-Menendez, S., Fernandez-Moran, M., Fernandez-Vega, I., Perez-Alvarez, A., & Villafani-Echazu, J. (2016). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. From evidence to therapeutic strategies. *J Neurol Sci*, *361*, 213-219. doi:10.1016/j.jns.2016.01.013
- Fierz, W. (2017). Multiple sclerosis: an example of pathogenic viral interaction? *Virology*, *14*(1), 42. doi:10.1186/s12985-017-0719-3
- Flynn, K. M., Michaud, M., & Madri, J. A. (2013). CD44 deficiency contributes to enhanced experimental autoimmune encephalomyelitis: a role in immune cells and vascular cells of the blood-brain barrier. *Am J Pathol*, *182*(4), 1322-1336. doi:10.1016/j.ajpath.2013.01.003
- Foster, L. C., Arkonac, B. M., Sibinga, N. E., Shi, C., Perrella, M. A., & Haber, E. (1998). Regulation of CD44 gene expression by the proinflammatory cytokine interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, *273*(32), 20341-20346.
- Fraser, J. R., Laurent, T. C., & Laurent, U. B. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*, *242*(1), 27-33.
- Freund, J., & McDermott, K. (1942). Sensitization to Horse Serum by Means of Adjuvants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *49*(4), 548-553. doi:10.3181/00379727-49-13625
- Freund, J., Stern, E. R., & Pisani, T. M. (1947). Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and Mycobacteria in water-in-oil emulsion. *J Immunol*, *57*(2), 179-194.
- Galandrini, R., Albi, N., Tripodi, G., Zarcone, D., Terenzi, A., Moretta, A., . . . Velardi, A. (1993). Antibodies to CD44 trigger effector functions of human T cell clones. *J Immunol*, *150*(10), 4225-4235.
- Gallatin, W. M., Wayner, E. A., Hoffman, P. A., St John, T., Butcher, E. C., & Carter, W. G. (1989). Structural homology between lymphocyte receptors for high endothelium and class III extracellular matrix receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(12), 4654-4658.
- Gee, K., Kryworuchko, M., & Kumar, A. (2004). Recent advances in the regulation of CD44 expression and its role in inflammation and autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, *52*(1), 13-26.
- Gent, W. L., Gregson, N. A., Gammack, D. B., & Raper, J. H. (1964). The Lipid-Protein Unit In Myelin. *Nature*, *204*, 553-555.
- Ghazi-Visser, L., Laman, J. D., Nagel, S., van Meurs, M., van Riel, D., Tzankov, A., . . . Gunthert, U. (2013). CD44 variant isoforms control experimental autoimmune encephalomyelitis by affecting the lifespan of the pathogenic T cells. *FASEB J*, *27*(9), 3683-3701. doi:10.1096/fj.13-228809
- Girgah, N., Letarte, M., Becker, L. E., Cruz, T. F., Theriault, E., & Moscarello, M. A. (1991). Localization of the CD44 glycoprotein to fibrous astrocytes in normal white matter and to reactive astrocytes in active lesions in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, *50*(6), 779-792.

- Gold, R., Linington, C., & Lassmann, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*, 129(Pt 8), 1953-1971. doi:10.1093/brain/awl075
- Goldberg, J., Clarner, T., Beyer, C., & Kipp, M. (2015). Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice. *J Mol Neurosci*, 57(2), 166-175. doi:10.1007/s12031-015-0595-5
- Goldstein, L. A., Zhou, D. F., Picker, L. J., Minty, C. N., Bargatze, R. F., Ding, J. F., & Butcher, E. C. (1989). A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell*, 56(6), 1063-1072.
- Grant, W. B. (2006). Epidemiology of disease risks in relation to vitamin D insufficiency. *Prog Biophys Mol Biol*, 92(1), 65-79. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.013
- Gregson, N. A. (1989). Lysolipids and membrane damage: lysolecithin and its interaction with myelin. *Biochem Soc Trans*, 17(2), 280-283.
- Groebe, A., Clarner, T., Baumgartner, W., Dang, J., Beyer, C., & Kipp, M. (2009). Cuprizone treatment induces distinct demyelination, astrocytosis, and microglia cell invasion or proliferation in the mouse cerebellum. *Cerebellum*, 8(3), 163-174. doi:10.1007/s12311-009-0099-3
- Guan, H., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2011). CD44 Reciprocally regulates the differentiation of encephalitogenic Th1/Th17 and Th2/regulatory T cells through epigenetic modulation involving DNA methylation of cytokine gene promoters, thereby controlling the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 186(12), 6955-6964. doi:10.4049/jimmunol.1004043
- Gudi, V., Gingele, S., Skripuletz, T., & Stangel, M. (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(73). doi:10.3389/fncel.2014.00073
- Gunthert, U., Stauder, R., Mayer, B., Terpe, H. J., Finke, L., & Friedrichs, K. (1995). Are CD44 variant isoforms involved in human tumour progression? *Cancer Surv*, 24, 19-42.
- Guo, Y., Wu, Y., Shinde, S., Sy, M. S., Aruffo, A., & Liu, Y. (1996). Identification of a costimulatory molecule rapidly induced by CD40L as CD44H. *J Exp Med*, 184(3), 955-961.
- Haegel, H., Tolg, C., Hofmann, M., & Ceredig, R. (1993). Activated mouse astrocytes and T cells express similar CD44 variants. Role of CD44 in astrocyte/T cell binding. *J Cell Biol*, 122(5), 1067-1077.
- Hall, S. M. (1972). The effect of injections of lysophosphatidyl choline into white matter of the adult mouse spinal cord. *J Cell Sci*, 10(2), 535-546.
- Hall, S. M., & Gregson, N. A. (1971). The in vivo and ultrastructural effects of injection of lysophosphatidyl choline into myelinated peripheral nerve fibres of the adult mouse. *J Cell Sci*, 9(3), 769-789.
- Haynes, B. F., Hale, L. P., Patton, K. L., Martin, M. E., & McCallum, R. M. (1991). Measurement of an adhesion molecule as an indicator of inflammatory disease activity. Up-regulation of the receptor for hyaluronate (CD44) in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 34(11), 1434-1443.

- Hiremath, M. M., Saito, Y., Knapp, G. W., Ting, J. P., Suzuki, K., & Matsushima, G. K. (1998). Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol*, 92(1-2), 38-49.
- Hodge-Dufour, J., Noble, P. W., Horton, M. R., Bao, C., Wysoka, M., Burdick, M. D., . . . Pure, E. (1997). Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J Immunol*, 159(5), 2492-2500.
- Hoflich, K. M., Beyer, C., Clarner, T., Schmitz, C., Nyamoya, S., Kipp, M., & Hochstrasser, T. (2016). Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach. *Brain Res*, 1650, 125-133. doi:10.1016/j.brainres.2016.08.048
- Hofstetter, H. H., Shive, C. L., & Forsthuber, T. G. (2002). Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol*, 169(1), 117-125.
- Hohlfeld, R., & Wekerle, H. (2001). Immunological update on multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*, 14(3), 299-304.
- Huet, S., Groux, H., Caillou, B., Valentin, H., Prieur, A. M., & Bernard, A. (1989). CD44 contributes to T cell activation. *J Immunol*, 143(3), 798-801.
- Hughes, E. N., Colombatti, A., & August, J. T. (1983). Murine cell surface glycoproteins. Purification of the polymorphic Pgp-1 antigen and analysis of its expression on macrophages and other myeloid cells. *J Biol Chem*, 258(2), 1014-1021.
- Hutás, G., Bajnok, É., Gál, I., Finnegan, A., Glant, T. T., & Mikecz, K. (2008). CD44-specific antibody treatment and CD44 deficiency exert distinct effects on leukocyte recruitment in experimental arthritis. *Blood*, 112(13), 4999-5006.
- Innes, J. R. (1951). Experimental "allergic" encephalitis: attempts to produce the disease in sheep and goats. *J Comp Pathol*, 61(4), 241-250.
- Islam, T., Gauderman, W. J., Cozen, W., & Mack, T. M. (2007). Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. *Neurology*, 69(4), 381-388. doi:10.1212/01.wnl.0000268266.50850.48
- Jain, M., He, Q., Lee, W. S., Kashiki, S., Foster, L. C., Tsai, J. C., . . . Haber, E. (1996). Role of CD44 in the reaction of vascular smooth muscle cells to arterial wall injury. *J Clin Invest*, 98(3), 877.
- Jalkanen, S., & Jalkanen, M. (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol*, 116(3), 817-825.
- Jalkanen, S. T., Bargatze, R. F., Herron, L. R., & Butcher, E. C. (1986). A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur J Immunol*, 16(10), 1195-1202. doi:10.1002/eji.1830161003
- Jeffery, N. D., & Blakemore, W. F. (1995). Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lysolecithin. *J Neurocytol*, 24(10), 775-781.
- Johnson, P., & Ruffell, B. (2009). CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 8(3), 208-220.

- Jordan, A. R., Racine, R. R., Hennig, M. J., & Lokeshwar, V. B. (2015). The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment. *Front Immunol*, 6, 182. doi:10.3389/fimmu.2015.00182
- Kaaijk, P., Pals, S. T., Morsink, F., Bosch, D. A., & Troost, D. (1997). Differential expression of CD44 splice variants in the normal human central nervous system. *J Neuroimmunol*, 73(1-2), 70-76.
- Kaaijk, P., Troost, D., Morsink, F., Keehnen, R. M., Leenstra, S., Bosch, D. A., & Pals, S. T. (1995). Expression of CD44 splice variants in human primary brain tumors. *J Neurooncol*, 26(3), 185-190.
- Karousou, E., Misra, S., Ghatak, S., Dobra, K., Gotte, M., Vigetti, D., . . . Skandalis, S. S. (2017). Roles and targeting of the HAS/hyaluronan/CD44 molecular system in cancer. *Matrix Biol*, 59, 3-22. doi:10.1016/j.matbio.2016.10.001
- Kaufmann, M., Heider, K. H., Sinn, H. P., von Minckwitz, G., Ponta, H., & Herrlich, P. (1995). CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet*, 345(8950), 615-619.
- Keegan, B. M., & Noseworthy, J. H. (2002). Multiple sclerosis. *Annu Rev Med*, 53, 285-302. doi:10.1146/annurev.med.53.082901.103909
- Keough, M. B., Jensen, S. K., & Yong, V. W. (2015). Experimental Demyelination and Remyelination of Murine Spinal Cord by Focal Injection of Lysolecithin. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(97), 52679. doi:10.3791/52679
- Khan, A. I., Kerfoot, S. M., Heit, B., Liu, L., Andonegui, G., Ruffell, B., . . . Kubes, P. (2004). Role of CD44 and hyaluronan in neutrophil recruitment. *The Journal of Immunology*, 173(12), 7594-7601.
- Kim, S., Cho, S. H., Kim, K. Y., Shin, K. Y., Kim, H. S., Park, C. H., . . . Suh, Y. H. (2009). Alpha-synuclein induces migration of BV-2 microglial cells by up-regulation of CD44 and MT1-MMP. *J Neurochem*, 109(5), 1483-1496. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06075.x
- Kipp, M., & Baumgartner, W. (2011). *"The cuprizone model and multiple sclerosis: disparities and similarities"*. (Dissertation), RWTH Aachen University. Retrieved from <http://publications.rwth-aachen.de/record/64260/files/3773.pdf>
- Kipp, M., & Beyer, C. (2009). Impact of sex steroids on neuroinflammatory processes and experimental multiple sclerosis. *Front Neuroendocrinol*, 30(2), 188-200. doi:10.1016/j.yfrne.2009.04.004
- Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., & Beyer, C. (2009). The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol*, 118(6), 723-736. doi:10.1007/s00401-009-0591-3
- Kipp, M., Nyamoya, S., Hochstrasser, T., & Amor, S. (2017). Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol*, 27(2), 123-137. doi:10.1111/bpa.12454
- Koritschoner, R., & Schweinburg, F. (1925). Induktion von Paralyse und Rückenmarksentzündung durch Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Rückenmarksgewebe. *Z Immunitätsf Exp Therapie*, 42, 217-283.

- Krauspe, B. M., Dreher, W., Beyer, C., Baumgartner, W., Denecke, B., Janssen, K., . . . Kipp, M. (2015). Short-term cuprizone feeding verifies N-acetylaspartate quantification as a marker of neurodegeneration. *J Mol Neurosci*, *55*(3), 733-748. doi:10.1007/s12031-014-0412-6
- Kuerten, S., & Angelov, D. N. (2008). Comparing the CNS morphology and immunobiology of different EAE models in C57BL/6 mice - a step towards understanding the complexity of multiple sclerosis. *Ann Anat*, *190*(1), 1-15. doi:10.1016/j.aanat.2007.11.001
- Lassmann, H., & Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, *133*(2), 223-244. doi:10.1007/s00401-016-1631-4
- Lassmann, H., Bruck, W., & Lucchinetti, C. (2001). Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*, *7*(3), 115-121.
- Lazaar, A. L., Albelda, S. M., Pilewski, J. M., Brennan, B., Pure, E., & Panettieri, R. A., Jr. (1994). T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis. *J Exp Med*, *180*(3), 807-816.
- Lindner, M., Heine, S., Haastert, K., Garde, N., Fokuhl, J., Linsmeier, F., . . . Stangel, M. (2008). Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *34*(1), 105-114. doi:10.1111/j.1365-2990.2007.00879.x
- Lipton, M. M., & Freund, J. (1952). Encephalomyelitis in the rat following intracutaneous injection of central nervous system tissue with adjuvant. *Proc Soc Exp Biol Med*, *81*(1), 260-261.
- Liu, Y., Han, S. S., Wu, Y., Tuohy, T. M., Xue, H., Cai, J., . . . Rao, M. S. (2004). CD44 expression identifies astrocyte-restricted precursor cells. *Dev Biol*, *276*(1), 31-46. doi:10.1016/j.ydbio.2004.08.018
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., & Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*, *47*(6), 707-717.
- Maggi, P., Macri, S. M., Gaitan, M. I., Leibovitch, E., Wholer, J. E., Knight, H. L., . . . Reich, D. S. (2014). The formation of inflammatory demyelinated lesions in cerebral white matter. *Ann Neurol*, *76*(4), 594-608. doi:10.1002/ana.24242
- Matsushima, G. K., & Morell, P. (2001). The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System. *Brain Pathology*, *11*(1), 107-116. doi:10.1111/j.1750-3639.2001.tb00385.x
- McCarthy, D. P., Richards, M. H., & Miller, S. D. (2012). Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods Mol Biol*, *900*, 381-401. doi:10.1007/978-1-60761-720-4_19
- McDonald, B., McAvoy, E. F., Lam, F., Gill, V., De La Motte, C., Savani, R. C., & Kubes, P. (2008). Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *Journal of Experimental Medicine*, *205*(4), 915-927.
- McKee, C. M., Lowenstein, C. J., Horton, M. R., Wu, J., Bao, C., Chin, B. Y., . . . Noble, P. W. (1997). Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages

- through a nuclear factor kappaB-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 272(12), 8013-8018.
- McKee, C. M., Penno, M. B., Cowman, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Bao, C., & Noble, P. W. (1996). Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest*, 98(10), 2403-2413. doi:10.1172/jci119054
- McKenzie, J. L., Dalchau, R., & Fabre, J. W. (1982). Biochemical characterisation and localization in brain of a human brain-leucocyte membrane glycoprotein recognised by a monoclonal antibody. *J Neurochem*, 39(5), 1461-1466.
- Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N., & Ben-Nun, A. (1995). A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol*, 25(7), 1951-1959. doi:10.1002/eji.1830250723
- Merat, S., Fruebis, J., Sutphin, M., Silvestre, M., & Reaven, P. D. (2000). Effect of aging on aortic expression of the vascular cell adhesion molecule-1 and atherosclerosis in murine models of atherosclerosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 55(2), B85-94.
- Mikecz, K., Brennan, F. R., Kim, J. H., & Glant, T. T. (1995). Anti-CD44 treatment abrogates tissue oedema and leukocyte infiltration in murine arthritis. *Nat Med*, 1(6), 558-563.
- Mikecz, K., Dennis, K., Shi, M., & Kim, J. H. (1999). Modulation of hyaluronan receptor (CD44) function in vivo in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 42(4), 659-668. doi:10.1002/1529-0131(199904)42:4<659::aid-anr8>3.0.co;2-z
- Moretto, G., Xu, R. Y., & Kim, S. U. (1993). CD44 expression in human astrocytes and oligodendrocytes in culture. *J Neuropathol Exp Neurol*, 52(4), 419-423.
- Morrison, L. R. (1947). Disseminated encephalomyelitis experimentally produced by the use of homologous antigen. *Arch Neurol Psychiatry*, 58(4), 391-416.
- Mummert, M. E., Mohamadzadeh, M., Mummert, D. I., Mizumoto, N., & Takashima, A. (2000). Development of a Peptide Inhibitor of Hyaluronan-Mediated Leukocyte Trafficking. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(6), 769-780.
- Naor, D., Sionov, R. V., & Ish-Shalom, D. (1997). CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res*, 71, 241-319.
- Naruse, M., Shibasaki, K., Yokoyama, S., Kurachi, M., & Ishizaki, Y. (2013). Dynamic changes of CD44 expression from progenitors to subpopulations of astrocytes and neurons in developing cerebellum. *PLoS One*, 8(1), e53109. doi:10.1371/journal.pone.0053109
- Nedvetzki, S., Gonen, E., Assayag, N., Reich, R., Williams, R. O., Thurmond, R. L., . . . Naor, D. (2004). RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: a different interpretation of redundancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(52), 18081-18086. doi:10.1073/pnas.0407378102
- Norkute, A., Hieble, A., Braun, A., Johann, S., Clamer, T., Baumgartner, W., . . . Kipp, M. (2009). Cuprizone treatment induces demyelination and astrocytosis in the mouse hippocampus. *J Neurosci Res*, 87(6), 1343-1355. doi:10.1002/jnr.21946
- Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., & Weinshenker, B. G. (2000). Multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 343(13), 938-952. doi:10.1056/nejm200009283431307

- Olitsky, P. K., & Yager, R. H. (1949). Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *J Exp Med*, 90(3), 213-224.
- Ousman, S. S., & David, S. (2000). Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord. *Glia*, 30(1), 92-104.
- Piao, J. H., Wang, Y., & Duncan, I. D. (2013). CD44 is required for the migration of transplanted oligodendrocyte progenitor cells to focal inflammatory demyelinating lesions in the spinal cord. *Glia*, 61(3), 361-367. doi:10.1002/glia.22438
- Pinner, E., Gruper, Y., Ben Zimra, M., Kristt, D., Laudon, M., Naor, D., & Zisapel, N. (2017). CD44 Splice Variants as Potential Players in Alzheimer's Disease Pathology. *J Alzheimers Dis*, 58(4), 1137-1149. doi:10.3233/jad-161245
- Ponta, H., Sherman, L., & Herrlich, P. A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(1), 33-45. doi:10.1038/nrm1004
- Pott, F., Gingele, S., Clarner, T., Dang, J., Baumgartner, W., Beyer, C., & Kipp, M. (2009). Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia. *Brain Res*, 1305, 137-149. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.084
- Praet, J., Guglielmetti, C., Berneman, Z., Van der Linden, A., & Ponsaerts, P. (2014). Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev*, 47, 485-505. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.10.004
- Procaccini, C., De Rosa, V., Pucino, V., Formisano, L., & Matarese, G. (2015). Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol*, 759, 182-191. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.042
- Pure, E., & Cuff, C. A. (2001). A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med*, 7(5), 213-221.
- Rafi-Janajreh, A. Q., Chen, D., Schmits, R., Mak, T. W., Grayson, R. L., Sponenberg, D. P., . . . Nagarkatti, P. S. (1999). Evidence for the involvement of CD44 in endothelial cell injury and induction of vascular leak syndrome by IL-2. *The Journal of Immunology*, 163(3), 1619-1627.
- Rall, C. J., & Rustgi, A. K. (1995). CD44 isoform expression in primary and metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, 55(9), 1831-1835.
- Rampon, C., Weiss, N., Deboux, C., Chaverot, N., Miller, F., Buchet, D., . . . Couraud, P. O. (2008). Molecular mechanism of systemic delivery of neural precursor cells to the brain: assembly of brain endothelial apical cups and control of transmigration by CD44. *Stem Cells*, 26(7), 1673-1682. doi:10.1634/stemcells.2008-0122
- Ransohoff, R. M. (2012). Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat Neurosci*, 15(8), 1074-1077. doi:10.1038/nn.3168
- Riessen, R., Wight, T. N., Pastore, C., Henley, C., & Isner, J. M. (1996). Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*, 93(6), 1141-1147.
- Rivers, T. M., Sprunt, D. H., & Berry, G. P. (1933). OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *The Journal of Experimental Medicine*, 58(1), 39-53. doi:10.1084/jem.58.1.39

- Ruffell, B. (2008). *Regulation and function of hyaluronan binding by CD44 in the immune system*. University of British Columbia.
- Schedl, M., Ruther, B. J., Grosse-Veldmann, R., Ohl, K., Tenbrock, K., Dreytmüller, D., . . . Kipp, M. (2016). Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain. *J Neurosci*, *36*(4), 1410-1415. doi:10.1523/JNEUROSCI.2456-15.2016
- Schmidt, T., Awad, H., Slowik, A., Beyer, C., Kipp, M., & Clarner, T. (2013). Regional heterogeneity of cuprizone-induced demyelination: topographical aspects of the midline of the corpus callosum. *J Mol Neurosci*, *49*(1), 80-88. doi:10.1007/s12031-012-9896-0
- Senbanjo, L. T., & Chellaiah, M. A. (2017). CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *5*, 18. doi:10.3389/fcell.2017.00018
- Sherman, L., Sleeman, J., Herrlich, P., & Ponta, H. (1994). Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*, *6*(5), 726-733.
- Sidman, Kosaras, Misra, & Senft. (2017). High Resolution Mouse Brain Atlas. Retrieved from <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>
- Siegelman, M. H., DeGrendele, H. C., & Estess, P. (1999). Activation and interaction of CD44 and hyaluronan in immunological systems. *Journal of leukocyte biology*, *66*(2), 315-321.
- Simon, J. C., Heider, K. H., Dietrich, A., Wuttig, C., Schopf, E., Adolf, G. R., . . . Herrlich, P. (1996). Expression of CD44 isoforms in human skin cancer. *Eur J Cancer*, *32a*(8), 1394-1400.
- Skipuletz, T., Lindner, M., Kotsiari, A., Garde, N., Fokuhl, J., Linsmeier, F., . . . Stangel, M. (2008). Cortical Demyelination Is Prominent in the Murine Cuprizone Model and Is Strain-Dependent. *The American Journal of Pathology*, *172*(4), 1053-1061. doi:10.2353/ajpath.2008.070850
- Smith, R. (1982). ¹H-nuclear magnetic resonance study of the association of the basic protein of central nervous system myelin with lysophosphatidylcholine. *Biophys Chem*, *16*(4), 347-354.
- Sneath, R. J., & Mangham, D. C. (1998). The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol*, *51*(4), 191-200.
- Soilu-Hanninen, M., Laaksonen, M., & Hanninen, A. (2005). Hyaluronate receptor (CD44) and integrin alpha4 (CD49d) are up-regulated on T cells during MS relapses. *J Neuroimmunol*, *166*(1-2), 189-192. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.05.008
- Sriram, S., & Steiner, I. (2005). Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, *58*(6), 939-945. doi:10.1002/ana.20743
- Steinman, L., & Zamvil, S. S. (2006). How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol*, *60*(1), 12-21. doi:10.1002/ana.20913
- Stys, P. K., Zamponi, G. W., van Minnen, J., & Geurts, J. J. (2012). Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci*, *13*(7), 507-514. doi:10.1038/nrn3275

- Suzuki, K. (1969). Giant hepatic mitochondria: production in mice fed with cuprizone. *Science*, 163(3862), 81-82.
- Tal, C., Laufer, A., & Behar, A. J. (1958). An experimental demyelinating disease in the Syrian hamster. *Br J Exp Pathol*, 39(2), 158-164.
- Taylor, L. C., Gilmore, W., & Matsushima, G. K. (2009). SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. *Brain Pathol*, 19(3), 467-479. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00230.x
- Thomas, L., Paterson, P. Y., & Smithwick, B. (1950). Acute disseminated encephalomyelitis following immunization with homologous brain extracts; studies on the role of a circulating antibody in the production of the condition in dogs. *J Exp Med*, 92(2), 133-152.
- Thorne, R. F., Legg, J. W., & Isacke, C. M. (2004). The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci*, 117(Pt 3), 373-380. doi:10.1242/jcs.00954
- Torkildsen, Ø., Brunborg, L. A., Myhr, K. M., & Bø, L. (2008). The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurologica Scandinavica*, 117, 72-76. doi:10.1111/j.1600-0404.2008.01036.x
- Tuohy, T. M., Wallingford, N., Liu, Y., Chan, F. H., Rizvi, T., Xing, R., . . . Sherman, L. S. (2004). CD44 overexpression by oligodendrocytes: a novel mouse model of inflammation-independent demyelination and dysmyelination. *Glia*, 47(4), 335-345. doi:10.1002/glia.20042
- Uberti, D., Cenini, G., Bonini, S. A., Barcikowska, M., Styczynska, M., Szybinska, A., & Memo, M. (2010). Increased CD44 gene expression in lymphocytes derived from Alzheimer disease patients. *Neurodegener Dis*, 7(1-3), 143-147. doi:10.1159/000289225
- van der Star, B. J., Vogel, D. Y., Kipp, M., Puentes, F., Baker, D., & Amor, S. (2012). In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11(5), 570-588.
- Vereyken, E. J., Fluitsma, D. M., Bolijn, M. J., Dijkstra, C. D., & Teunissen, C. E. (2009). An in vitro model for de- and remyelination using lysophosphatidyl choline in rodent whole brain spheroid cultures. *Glia*, 57(12), 1326-1340. doi:10.1002/glia.20852
- Vogel, H., Butcher, E. C., & Picker, L. J. (1992). H-CAM expression in the human nervous system: Evidence for a role in diverse glial interactions. *Journal of Neurocytology*, 21(5), 363-373. doi:10.1007/BF01191704
- Wang, S. J., Wong, G., de Heer, A. M., Xia, W., & Bourguignon, L. Y. (2009). CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Laryngoscope*, 119(8), 1518-1530. doi:10.1002/lary.20506
- Waxman, F. J., Fritz, R. B., & Hinrichs, D. J. (1980). The presence of specific antigen-reactive cells during the induction, recovery, and resistance phases of experimental allergic encephalomyelitis. *Cell Immunol*, 49(1), 34-42.
- Weber, G. F., Bronson, R. T., Ilagan, J., Cantor, H., Schmits, R., & Mak, T. W. (2002). Absence of the CD44 gene prevents sarcoma metastasis. *Cancer Res*, 62(8), 2281-2286.

- Wielenga, V. J., Heider, K. H., Offerhaus, G. J., Adolf, G. R., van den Berg, F. M., Ponta, H., . . . Pals, S. T. (1993). Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res*, *53*(20), 4754-4756.
- Winkler, C. W., Foster, S. C., Matsumoto, S. G., Preston, M. A., Xing, R., Bebo, B. F., . . . Sherman, L. S. (2012). Hyaluronan anchored to activated CD44 on central nervous system vascular endothelial cells promotes lymphocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Biol Chem*, *287*(40), 33237-33251. doi:10.1074/jbc.M112.356287
- Woodruff, R. H., & Franklin, R. J. (1999). Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: a comparative study. *Glia*, *25*(3), 216-228.
- Yamane, N., Tsujitani, S., Makino, M., Maeta, M., & Kaibara, N. (1999). Soluble CD44 variant 6 as a prognostic indicator in patients with colorectal cancer. *Oncology*, *56*(3), 232-238. doi:11970
- Zeidler, A., Bräuer, R., Thoss, K., Bahnsen, J., Heinrichs, V., Jablonski-Westrich, D., . . . Hamann, A. (1995). Therapeutic effects of antibodies against adhesion molecules in murine collagen type II-induced arthritis. *Autoimmunity*, *21*(4), 245-252.

VI. Eidesstattliche Versicherung

Pröbstl Nicolas

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Die Expression von CD44 in murinen Multiple Sklerose Tiermodellen“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 06.08.2018

Ort, Datum

Nicolas Pröbstl

Unterschrift Doktorand

VII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die diese Arbeit ermöglicht und auf ihre Art unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, für die Betreuung meiner Promotion. Er stand mir während der gesamten Arbeit mit seinem ausgezeichneten akademischen Rat zur Seite. Sowohl bei der Durchführung der Versuche, als auch bei der Auswertung der Ergebnisse und der Korrektur meiner Niederschrift konnte ich mich jederzeit auf seine Hilfe, seine konstruktiven Anregungen und seine Motivation verlassen. Bei jeder noch so kleinen Frage konnte ich mich an Ihn wenden und er investierte viel Zeit und Mühe in die Betreuung dieser Arbeit, wofür ich mich ganz herzlich bedanken möchte.

Herr Prof. Dr. med. Christoph Schmitz danke ich dafür, dass ich meine Promotion an seinem Lehrstuhl anfertigen durfte und von allen Mitarbeitern dabei unterstützt wurde.

Ebenso danke ich ganz besonders Frau Dr. Tanja Hochstrasser für die hervorragende Unterstützung bei meiner Arbeit und die kompetente Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche und der statistischen Auswertung.

Ein besonderer Dank geht an die technischen Mitarbeiter/innen des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt der LMU München, insbesondere Frau Beate Aschauer und Frau Astrid Baltruschat. Sie standen mir zu jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und hatten immer ein offenes Ohr für mich. Das ist sehr viel Wert und dafür möchte ich mich nochmals ganz herzlich bedanken.

Ebenso danke ich meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders meiner Verlobten, für die unermüdliche Unterstützung und Hilfe während der gesamten Zeit. Ihr standet mir immer zur Seite und habt mich auf eure Art unterstützt. Dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.