

**Inhibierung des IL-17A vermittelten
Blut-Hirnschrankenversagens in
experimenteller
Autoimmunen zephalomyelitis (EAE)
und
Mikrogliaaktivierung durch IL-17A**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz**

vorgelegt von

**Jula Huppert
geb. am 04.06.1982 in Göppingen**

Mainz 2010

Dekan:
1.Berichterstatter:
2.Berichterstatter:

Mündliche Prüfung: 14.7.2010

Danksagung

Zusammenfassung

Experimentelle Autoimmunenkephalomyelitis (EAE) ist das Tiermodell für Multiple Sklerose (MS). Es ist bekannt, dass das proinflammatorische Zytokin IL-17A eine wichtige Rolle in MS und EAE spielt. Dieses wird hauptsächlich von einer Subpopulation der T-Helferzellen (Th17 Zellen) exprimiert. Es war bekannt, dass diese am Zusammenbruch der Blut-Hirnschranke (BHS) beteiligt sind. Der Integritätsverlust der BHS ist ein wichtiger und früherer Aspekt in der Pathogenese von EAE und MS. Daraufhin können Immunzellen in das zentrale Nervensystem (ZNS) eindringen. Spezifische T-Zellen greifen das Myelin an und führen so zu einer Entzündungsreaktion, Demyelinisierung und axonalem Schaden.

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass durch Hemmung des kontraktiven endothelialen Apparates das BHS Versagen vermindert werden kann und es dadurch zu einem milderen Verlauf der EAE Pathogenese kommt. Wird der Inhibitor der Myosinleichte Kettenkinase ML-7 C57/bl6 Mäusen, bei denen EAE induziert wurde, intraperitoneal verabreicht, kommt es zu einem geringeren Phosphorylierungsgrad der leichten Kette des Myosins in Endothelzellen und folglich zu einem verringerten Schrankenversagen. Außerdem konnte ich zeigen, dass weniger reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden. Folglich kommt es zu einer geringeren Infiltration von Immunzellen aus der Peripherie in das ZNS. Somit werden weniger Zytokine und auch Matrixmetalloproteinasen (MMP) ausgeschüttet, wodurch die Entzündungsreaktion weniger stark ausgeprägt ist. Außerdem werden weniger Mikrogliazellen aktiviert.

Ich habe den Zusammenhang zwischen Mikrogliazellaktivierung und IL-17A näher untersucht. Dieses proinflammatorische Zytokin aktiviert Mikrogliazellen auch *in vitro*. Durch IL-17A Stimulation kommt es zur vermehrten ROS Bildung. Folglich kommt es zu einer vermehrten Proliferation und Migration, sowie einer erhöhten Zytokinproduktion. Außerdem konnte ich zeigen, dass der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor an der Mikrogliaaktivierung beteiligt ist. Abhängig von IL-17A Stimulation kommt es zu einem Kalziumeinstrom über den NMDA-Rezeptor. Werden Inhibitoren des NMDA-Rezeptors eingesetzt, können IL-17A vermittelte Proliferation, Migration, Zytokin- und ROS-Produktion verhindert werden. Der NMDA-Rezeptor ist sehr gut in Neuronen erforscht, wohingegen bisher sehr wenig über seine Funktion in Gliazellen bekannt war. In dieser Arbeit ist es mir gelungen einen Zusammenhang zwischen IL-17A vermittelter Mikrogliaaktivierung und Kalziumeinstrom über den NMDA-Rezeptor herzustellen.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG.....	III
ZUSAMMENFASSUNG	IV
INHALTSVERZEICHNIS.....	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 EXPERIMENTELLE AUTOIMMUNENZEPHALOMYELITIS (EAE) ALS TIERMODELL FÜR MULTIPLE SKLEROSE.....	1
1.1.1 <i>Multiple Sklerose</i>	1
1.1.2 <i>EAE als Modell für MS</i>	2
1.1.3 <i>Aktiv immunisierte MOG EAE</i>	3
1.1.4 <i>Weitere EAE Modelle in Mäusen</i>	7
1.2 T-HELPERZELLEN UND INTERLEUKIN 17	8
1.2.1 <i>Th17 Zellen</i>	8
1.2.2 <i>Interleukin 17</i>	10
1.2.3 <i>IL-17A Rezeptor</i>	11
1.2.4 <i>IL-17A Signalweg</i>	11
1.2.5 <i>IL-17A in MS und EAE</i>	12
1.3 BLUT-HIRNSCHRANKE (BHS)	13
1.3.1 <i>Verlust der Bluthirnschrankenintegrität bei Multipler Sklerose</i>	13
1.3.2 <i>Aufbau der BHS</i>	13
1.3.3 <i>Endothelzellen im zentralen Nervensystem</i>	14
1.3.4 <i>Perizyten</i>	16
1.3.5 <i>Astrozyten</i>	16
1.3.6 <i>Das ZNS als immunprivilegierter Raum und der Eintritt von Lymphozyten</i>	17
1.3.7 <i>Matrixmetalloproteinasen</i>	18
1.3.8 <i>Einfluss des kontraktiven Apparats auf die BHS-Integrität</i>	19
1.4 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS).....	20
1.4.1 <i>Beteiligung der reaktiven Sauerstoffspezies an MS und EAE</i>	20
1.4.2 <i>Entstehung von ROS</i>	21
1.4.3 <i>ROS im ZNS</i>	22
1.5 MIKROGLIA	22
1.5.1 <i>Beschreibung von Mikroglia</i>	22

1.5.2 Biologische Antworten aktivierter Mikroglia	23
1.5.3 BV-2 Zellen	24
1.5.4 Mikroglia in EAE und MS	25
1.5.5 IL-17A und Mikroglia.....	25
1.5.6 Beteiligung von Ca^{2+} an der Mikrogliaaktivierung	26
1.5.7 Glutamat-Rezeptortypen und deren Vorkommen.....	26
1.5.8 NMDA-Rezeptor und EAE und MS.....	27
1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	28
2. MATERIAL UND METHODEN.....	29
2.1 MATERIALLISTE.....	29
2.1.1 Chemikalien	29
2.1.2 Geräte.....	30
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	31
2.1.4 Kits	32
2.1.5 Software.....	32
2.2 EAE EXPERIMENTE.....	33
2.2.1 Tierhaltung	33
2.2.2 EAE Induktion in C57/bl6 Mäusen und ML-7 Gabe.....	33
2.2.3 Perfusion.....	34
2.2.4 RNA Isolierung	34
2.2.5 Transkription	35
2.2.6 Realtime PCR.....	35
2.2.7 Konventionelle RT-PCR	36
2.2.8 Evans Blau.....	37
2.2.9 Immunzellisolierung und FACS Analyse.....	37
2.2.10 In vivo ROS Messung	38
2.2.10.1 ROS Detektion im Gesamthomogenat	38
2.2.10.2 ROS Detektion in Endothelzellen.....	38
2.2.11 Immunhistologie.....	38
2.3 BV-2 ZELLEXPIMENTE	39
2.3.1 Kultivierung der Zelllinie BV-2	39
2.3.2 Trypsinisieren	40
2.3.3 ROS Detektion in vitro	40

2.3.3.1	<i>Kontinuierliche Messung der ROS Produktion</i>	40
2.3.3.2	<i>Endpunktmessung ROS Detektion</i>	41
2.3.4	<i>Proliferationsassay</i>	41
2.3.5	<i>Migration</i>	41
2.3.6	<i>Kalzium Messung</i>	42
2.3.7	<i>Glutamatassay</i>	43
2.3.8	<i>NMDA-Rezeptordetektion durch In Cell Western</i>	43
2.3.9	<i>Zytokinbestimmung mit Luminexassay</i>	43
2.4	KORTIKALE ORGANOTYPISCHE KULTUREN	44
2.4.1	<i>Präparation</i>	44
2.4.2	<i>Haltung der Kulturen</i>	44
2.4.3	<i>Immunfärbung</i>	44
2.5	STATISTIK	45
3.	ERGEBNISSE	46
3.1	WIRKUNG VON ML-7 AUF EAE	46
3.1.1	<i>Klinischer EAE Verlauf bei Gabe von ML-7</i>	46
3.1.2	<i>Permeabilisierung der BHS</i>	47
3.1.3	<i>Detektion von pMLC</i>	50
3.1.4	<i>Infiltration von Immunzellen</i>	50
3.1.5	<i>Reduzierte mRNA Expression von Th17 Zytokinen</i>	51
3.1.6	<i>Expressionsmuster weiterer EAE relevanter Gene</i>	52
3.1.7	<i>ROS Detektion in EAE Tieren</i>	54
3.1.8	<i>Aktivierte Mikroglia in EAE Tieren</i>	55
3.2	EFFEKTE VON IL-17A AUF MIKROGLIA	56
3.2.1	<i>Th17 Zytokine aktivieren Mikroglia</i>	56
3.2.2	<i>Spezifische Mikrogliaaktivierung durch 100 ng/ml IL-17A</i>	57
3.2.3	<i>BV-2 Zellen exprimieren den IL-17RA Rezeptor</i>	59
3.2.4	<i>Einfluss von IL-17A auf die ROS Produktion</i>	59
3.2.5	<i>Quellen der ROS Produktion</i>	61
3.2.6	<i>Proliferation nach IL-17A Stimulation</i>	62
3.2.7	<i>Vermehrte Migration durch IL-17A Stimulus</i>	63
3.2.8	<i>Inhibierung der IL-17A vermittelten Migration</i>	64

3.3 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN INTRAZELLULÄREM KALZIUM-GEHALT UND IL-17A VERMITTELTEN MIKROGLIAAKTIVIERUNG	66
3.3.1 NMDA- Rezeptoruntereinheit NR1 ist auf BV-2 Zellen exprimiert	66
3.3.2 Hemmung der ROS Produktion durch NMDA-Rezeptor Blockierung.....	66
3.3.3 Hemmung der IL-17A vermittelten Proliferation durch NMDA-Rezeptor Blockierung	67
3.3.4 Zytokinfreisetzung nach IL-17A Stimulation.....	68
3.3.5 Kalziummessung	69
3.3.6 NMDA-Rezeptor Expression.....	71
3.3.7 NMDA-Rezeptor Proteinlevel.....	72
3.3.8 NMDA-Rezeptor Phosphorylierung.....	72
3.3.9 Glutamatfreisetzung durch BV-2 Zellen.....	74
3.3.10 Hemmung der Mikrogliaaktivierung in organotypischen Kulturen.....	74
4. DISKUSSION	76
4.1 ZUSAMMENFASSUNG.....	76
4.2 EINFLUSS DES MLC KINASE INHIBITOR ML-7 AUF DIE PATHOGENESE VON EAE	78
4.3 WIRKUNG VON IL-17A AUF MIKROGLIA.....	81
4.4 BETEILIGUNG DES NMDA-REZEPTORS AN DER IL-17A VERMITTELTEN MIKROGLIAAKTIVIERUNG.....	83
5. AUSBLICK.....	85
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
LITERATURVERZEICHNIS.....	XI
LEBENS LAUF	XX

1. EINLEITUNG

1.1 Experimentelle Autoimmunenkephalomyelitis (EAE) als Tiermodell für Multiple Sklerose

1.1.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) wird als T-Zell vermittelte Autoimmunkrankheit angesehen. T-Lymphozyten, die spezifisch für das Myelin Antigen sind, richten sich gegen die die Axone umgebende Myelinscheide und starten so eine Entzündungsreaktion. Das führt zu Demyelinisierung und anschließend zu axonaler Schädigung. Während akuter Phasen oder bei Rückschlägen bilden sich in MS Patienten Läsionen in der weißen Substanz (Gold et al., 2006). Bei fortschreitender Krankheit wird das komplette zentrale Nervensystem (ZNS) angegriffen.

MS ist ein komplexes Krankheitsbild, das heterogene klinische, pathologische und immunologische Phänotypen hat. So sollte man besser von einem Syndrom als von einer spezifischen Krankheit sprechen (Gold et al., 2006). Man unterscheidet vier Hauptformen der MS (Lassmann et al., 2007) (Abb.1):

- a) Schubförmig remittierende MS (RRMS): einzelne entzündliche Schübe lassen sich voneinander abgrenzen, die sich vollständig oder unvollständig zurückbilden.
- b) Sekundär progressive MS (SPMS): nach anfänglichem schubförmigen Krankheitsverlauf kommt es zu einer progressiven Phase.
- c) Primär progressive MS (PPMS): Der Krankheitsverlauf ist von Beginn an fortschreitend.
- d) Schubförmig fortschreitende MS (PRMS): Der Krankheitsverlauf ist von Beginn an fortschreitend. Zwischenzeitlich gibt es aber auch noch zusätzlich einzelne entzündliche Schübe.

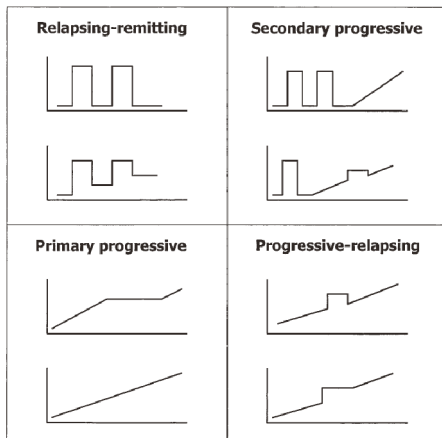


Abb.1: Unterarten des Krankheitsverlaufs bei multipler Sklerose: Schubförmig remittierend, sekundär progressiv, primär progressiv und schubförmig fortschreitend (aus: Kieseier, Hartung 2003).

Die Entzündungsreaktion wird dominiert von T-Zellen, Makrophagen und aktivierten Mikroglia. In aktiven Läsionen wird dieser Entzündungsprozess von einer Schädigung der Blut-Hirnschranke (BHS) (Hochmeister et al, 2006), wie auch der vermehrten Expression von Zytokinen, Chemokinen und deren Rezeptoren begleitet (Canella, 1995). Es kommt zur kompletten Demyelinisierung und zu einer teilweisen akuten axonalen Schädigung und auch axonalem Verlust (Ferguson, 1997). Allerdings kann es auch zu Remyelinisierungsprozessen kommen (Kornek et al., 2000). In der progressiven Phase ist die Pathologie anders: es findet ein diffuser Entzündungsprozess mit einer starken Mikroglia-Aktivierung und diffuser axonaler Schädigung statt, der der Demyelinisierung folgt (Kutzelnigg, Lassmann, 2006). Außer diesen Schäden in der weißen Substanz wird auch die graue Substanz beschädigt. Um die immunologischen Mechanismen, die dieser komplexen Krankheit zu Grunde liegen verstehen und erforschen zu können und um effektive therapeutische Ansätze zu entwickeln, wird häufig ein Tiermodell verwendet: die experimentelle Autoimmunenzenzephalomyelitis (EAE).

1.1.2 EAE als Modell für MS

EAE wurde zuerst in Primaten induziert (Rivers et al., 1933). Die Induktion beruht darauf, dass ein Peptid des Myelins in gesunde Tiere injiziert wird und es somit zur Bildung von Antikörpern gegen dieses Peptid kommt. Auf diese Weise wird eine Autoimmunantwort gegen Myelin induziert. In EAE Modellen bilden sich Läsionen im ZNS, die denjenigen in humaner MS stark ähneln. Inzwischen kann EAE in vielen verschiedenen Spezies induziert werden: Meerschweinchen, Kaninchen, Mäuse, Ratten, Hamster, aber auch in Hunden, Schafen, Ziegen und Affen (Baxter 2007). Jules Freund hat ein auf Mineralöl basiertes Adjuvans erfunden, das es erlaubt EAE nur mit einer einzigen Injektion zu induzieren

(Freund, Thomson, 1945; Kabat et al., 1951). In den 1950er Jahren setzte sich die Verwendung von hitzeinaktivierten *Mycobacteria tuberculosis* in Meerschweinchen und Ratten durch, die die Immunreaktion verstärken. Seitdem spricht man von kompletten Freund's Adjuvans (CFA). Ich werde in Folgenden nur auf Mäuse eingehen, da die Experimente dieser Arbeit ausschließlich an dieser Spezies durchgeführt wurden. EAE in Mäusen wurde bereits 1949 beschrieben (Olitsky, Yager, 1949). In den 1950er Jahren wurden aber noch überwiegend Ratten und Meerschweinchen als Versuchstiere verwendet, weil deren Krankheitsverlauf stärker und homogener war. Dies änderte sich mit der Einführung des Pertussis Toxins und mit der Züchtung weiterer Mausstämme. Somit konnten dann auch in Mäusen starke und reproduzierbare EAE Verläufe erreicht werden. Abhängig vom Autoantigen, Mausstamm und der Art der Immunisierung können verschiedene Ausprägungen der humanen MS gezeigt und somit analysiert werden.

So sind heute PLP induzierte EAE in SLJ Mäusen, MBP induzierte EAE in PL/J Mäusen und MOG induzierte EAE in C57/bl6 Mäusen gängige Modelle. In dieser Arbeit wird die MOG induzierte EAE in C57/bl6 Mäusen verwendet.

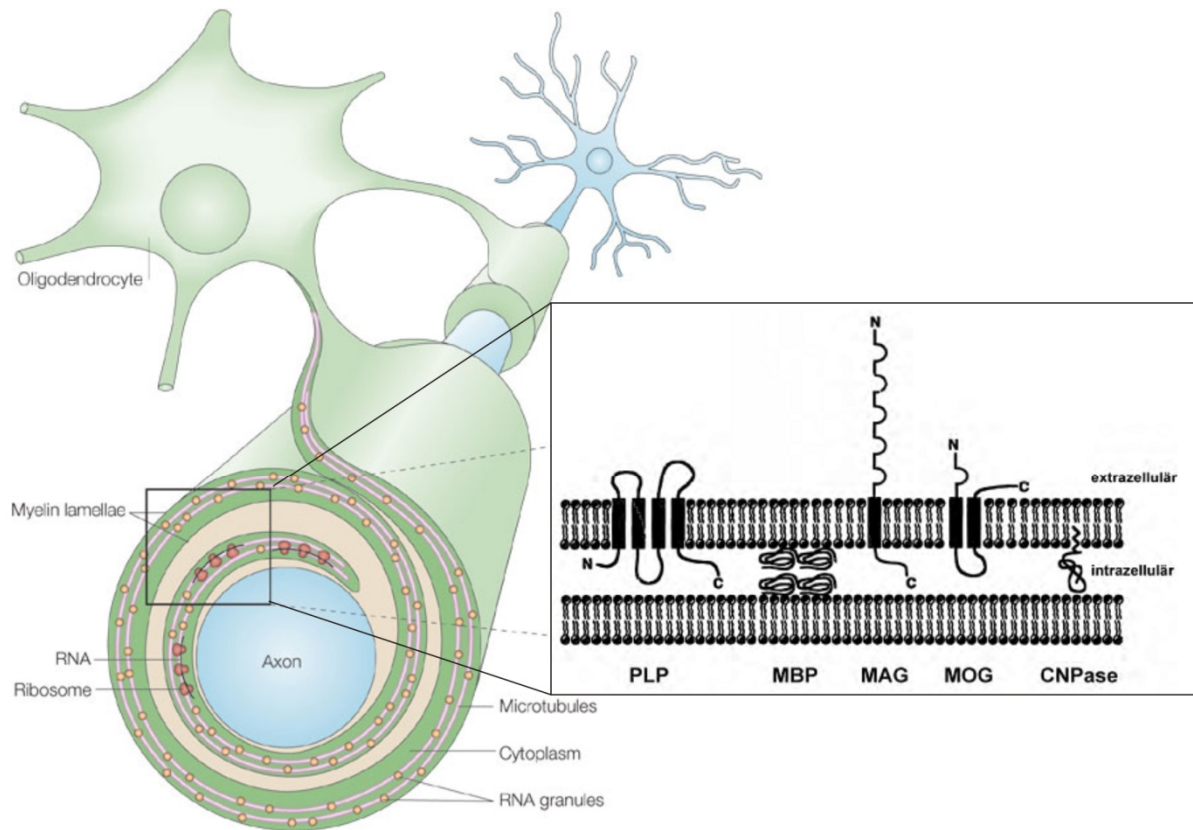
Der C57/bl6 Mausstamm ist ein Inzuchtstamm, welcher 1921 von CC Little entwickelt wurde. Dabei handelt es sich um einen schwarzen Mausstamm, der häufig für transgene und knockout Mäuse verwendet wird. Mit MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) kann man durch aktive Immunisierung einen monophasischen EAE Krankheitsverlauf erreichen.

Für die hier vorliegende Arbeit ist die aktive MOG Immunisierung relevant, sodass diese hier näher beschrieben wird und im Anschluss die anderen Modelle erwähnt werden.

1.1.3 Aktiv immunisierte MOG EAE

Die saltatorische Erregungsleitung in Axonen erhöht die Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung im Vergleich zum Durchmesser des Axons enorm. Dafür ist es nötig, dass sich eine vielschichtige Myelinschicht um das Axon herum befindet. Diese wird durch die Fortsätze der Oligodendrozyten gebildet. Oligodendrozyten gehören wie die Astrozyten und die Mikroglia zu den Gliazellen des Gehirns. Die Fortsätze der Oligodendrozyten bilden einen Membranstapel um die Axone herum und scheinen äußerst vielfältige Aufgaben bei der Versorgung und Kommunikation der Neurone zu haben. In dieser dichten Myelinscheide sind bestimmte charakteristische Proteine lokalisiert: Myelin basic protein (MBP) und Proteolipid Protein (PLP). Außerdem werden verschiedene Glykoproteine wie myelin-associated

glycoprotein (MAG) und myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) exprimiert. MOG ist auf der extrazellulären Seite der Myelinscheide lokalisiert (Abb.2). Das MOG Protein besteht aus 218 Aminosäuren und ist ein Mitglied der Ig Superfamilie (Gardinier et al., 1992).



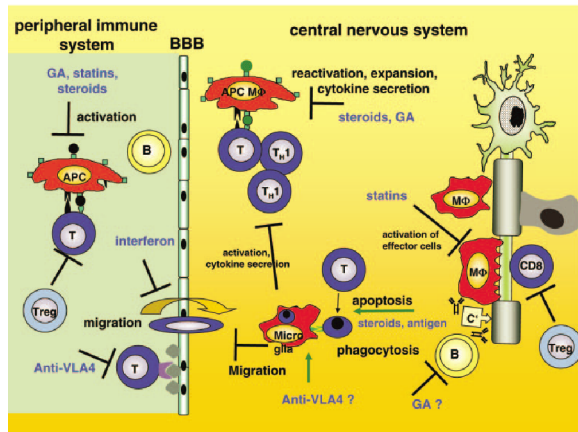
Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Neuroscience

Abb.2: Lokalisierung des MOG Proteins: Neurone sind von einer Myelinscheide umgeben, die die saltatorische Erregungsleitung ermöglicht. Diese wird von Oligodendrozyten gebildet. Die eng gewundene Membran hat eine charakteristische Zusammensetzung aus Lipiden und Proteinen. Wichtige Bestandteile sind PLP, MBP, MAG und MOG (modifiziert nach Sherman, Brophy 2005).

Zur Autoimmunisierung der Versuchstiere wird nicht das komplette Protein eingesetzt, sondern nur ein Peptid. Im Allgemeinen werden die Aminosäuren 35-55 verwendet. Wird MOG zur Autoimmunisierung benutzt, führt das nicht nur zur enzephalogenen T-Zellantwort sondern auch zur Demyelinisierung durch die Autoantikörperantwort. Somit können viele Aspekte des komplexen Krankheitsgeschehens von MS im Tiermodell reproduziert werden. Allerdings kann nur ein monophasischer Krankheitsverlauf in C57/bl6 Mäusen erreicht werden.

Der Nachweis der pathologischen Rolle von T-Lymphozyten in EAE wurde durch den passiven Transfer von ZNS spezifischen T-Zellen von Ben-Nun et al., 1981 erbracht. Es ist aber ein ganzes Netzwerk von Immunzellen aktiv, die die Expansion und Kontrolle der T-Zellen regulieren. Das Antigen muss von Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die zu den dendritischen Zellen gehören, aufgenommen und den T-Zellen präsentiert werden (Abb.3A). Naive T-Zellen werden somit aktiviert (Gold et al., 2006). Ebenfalls wird die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen angeregt. T- und auch B-Zellklone werden in den peripheren lymphatischen Organen durch das Myelin Antigen aktiviert. Dann überqueren diese myelin-spezifischen Immunzellen die BHS und können expandieren. CD8⁺T-Zellen werden durch die Präsentation auf MHC Klasse II Molekülen aktiviert, CD4⁺ T-Zellen durch die Präsentation auf MHC Klasse I Molekülen. Im Mausmodell werden hauptsächlich CD4⁺ Zellen aktiviert, wohingegen sich in aktiven humanen MS Läsionen viele CD8⁺ Zellen finden (Neumann et al., 2002). Die eingewanderten T-Zellen rekrutieren Makrophagen und Monozyten in das ZNS. Autoreaktive T-Zellen müssen der Selektion im Thymus entkommen, sowie der Kontrolle der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Anschließend müssen die aktivierten autoreaktiven T-Zellen über die Bluthirnschranke wandern. Dafür regulieren sie Adhäsionsmoleküle hoch und binden an Endothelzellen (Engelhard und Ransohoff, 2005). Für die Transmigration werden Matrix Metalloproteinasen benötigt, die ebenfalls in EAE hochreguliert werden (Kieseier et al., 1998). Anschließend startet die lokale Interaktion zwischen diesen T-Zellen und APCs im ZNS (Flügel, 2001). Klinische Symptome zeigen sich nur, wenn diese Reaktivierung der T-Zellen im ZNS ausreichend erfolgt. Nun entsteht der erste Schaden durch autoreaktive T-Zellen am Myelin. Dies rekrutiert weitere Makrophagen und aktiviert das Komplementsystem, was zur Schädigung der Oligodendrozyten führen kann (Abb.3B). Die aktivierten Makrophagen wie auch die Mikroglia sekretieren schädliche Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Redfort et al., 1997), MMPs (Leppert et al., 2001) und Exotoxine (Smith et al., 2000). Diese Stoffe schädigen Axone unabhängig von der Demyelinisierung. Der kausale Zusammenhang von Demyelinisierung und axonaler Schädigung ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Geschädigte Myelinscheiden führen zu Schäden am Axon, andererseits können auch geschädigte Axone zum Abbau der Myelinscheide führen. Um die Immunantwort zu regulieren und zu stoppen, was im Fall der EAE Mäuse zur Erholung führt, kommen $\gamma\delta$ T-Zellen (Ponomarev, Dittel, 2005) und konventionelle T_{regs} zum Einsatz.

A



B

Destruction patterns in the MS plaque

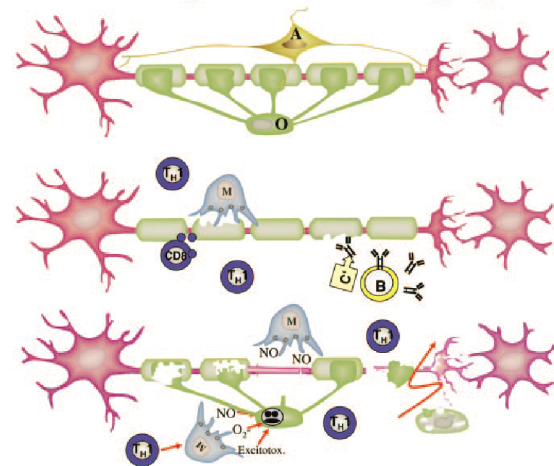


Abb.3: Immunantwort in EAE: Das Myelinpeptid wird von APCs präsentiert, dies führt zur Aktivierung von spezifischen T-Zellen. Diese wandern über die BHS (engl. BBB). Im ZNS kommt es zur Reaktivierung und Expansion von T-Zellen und zur Sekretion von Zytokinen sowie zur Aktivierung von Mikroglia (A). Die Myelinscheide wird angegriffen. Es kommt zur Schädigung von Axonen und Oligodendrozyten (B) (aus Gold et al., 2006).

Sowohl die Demyelinisierung als auch die Einwanderung von Immunzellen zeigt sich deutlich in der Histologie vom ZNS bei Mäusen, in denen EAE induziert wurde (Abb.4).

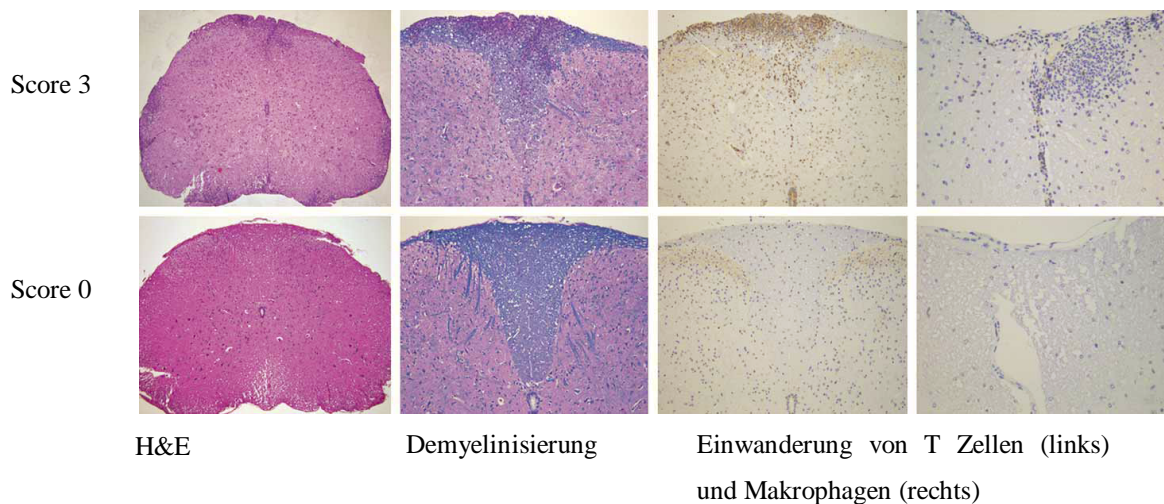


Abb.4: Histologische Befunde bei EAE Tieren: Verstärkte Einwanderung von Zellen, speziell von T-Zellen und Makrophagen sowie Demyelinisierung kann bei Tieren mit klinischen Symptomen (hier Score 3) dargestellt werden. Score 0 zeigt die Situation im nicht erkrankten Tier (aus Brüstle et al., 2007).

Klinische Symptome der Mäuse sind eine aufsteigende Paralyse, beginnend mit dem Verlust des Schwanztonus, des Aufrichtungsreflexes und der Parese der hinteren Extremitäten. Die klinischen Symptome werden standardisiert in „Scores“ auf einer Skala von 0 bis 6 eingeteilt. Die ersten klinischen Symptome treten meistens 8-10 Tage nach der Immunisierung auf. Der Höhepunkt der Krankheit ist um Tag 20, anschließend kommt es zu einer meist vollständigen Erholung der Tiere.

1.1.4 Weitere EAE Modelle in Mäusen

EAE kann mit weiteren Bestandteilen der Myelinscheide (MAG, PLP und MBP), aber auch mit Antigenen, die spezifisch für Astrozyten oder Neurone sind (GFAP, Transaldolase, Ma, APP) ausgelöst werden (Tabelle 1). Immunisierung mit PLP führt zu einem schubförmig remittierenden EAE Verlauf. Der Verlauf von EAE hängt nicht nur vom gewählten Antigen und Protokoll ab, sondern auch ganz entscheidend vom Mausstamm. So zeigen MOG immunisierte SLJ Mäuse im Gegensatz zu C57/bl6 Mäusen mit MOG einen schubförmig remittierenden Krankheitsverlauf. Somit sollte man je nach Fragestellung dasjenige Tiermodell wählen, das am besten die spezifischen Aspekte des insgesamt komplexen MS Krankheitsbild widerspiegelt.

Andererseits kann EAE passiv durch die Übertragung von Myelin spezifischen T-Zellen ausgelöst werden (Stromnes, Goverman, 2006). Diese werden aus einem aktiv immunisierten Tier isoliert und in ein naives Tier übertragen. Im Allgemeinen handelt es sich dabei um CD4⁺ T-Helferzellen. Diese Methode eignet sich sehr gut, um die Reaktionen von T-Zellen in Mäusen mit verschiedenen genetischen Hintergründen zu untersuchen. Außerdem kann man die T-Zellen *in vitro* manipulieren, bevor sie wieder in ein Tier eingeführt werden.

Es gibt keine Tiermodelle von spontaner MS in Wildtypmäusen. Allerdings sind inzwischen einige transgene Mausstämme verfügbar, die spontan EAE entwickeln, wie z.B. eine Maus, welche das Gen für MBP-spezifische T-Zellrezeptoren (TCR) trägt.

Table 1 Commonly used rodent EAE models

Model	Similarities to human disease	Differences from human disease	Further comments
Lewis rat Active EAE (CNS myelin, MBP, MOG, PLP)	T-cell inflammation and weak antibody response	Monophasic, little demyelination	Reliable model, commonly used for therapy studies. With guinea-pig MBP little demyelination
Adoptive-transfer EAE (MBP, S-100, MOG, GFAP)	Marked T-cell inflammation. Topography of lesions	Monophasic, little demyelination	Homogeneous course, rapid onset. Differential recruitment of T cells/macrophages depending on autoantigen
Active EAE or AT-EAE + co-transfer of anti-MOG antibodies	T-cell inflammation and demyelination	Only transient demyelination	Basic evidence for role of antibodies in demyelination
Congenic Lewis, DA, BN strains Active EAE (recombinant MOG aa 1-125)	Relapsing-remitting disorders, may completely mimic histopathology of multiple sclerosis and subtypes	No spontaneous disease	Chronic disease course, affection of the optic nerve, also axonal damage similar to multiple sclerosis
Murine EAE (SJL, C57BL/6, PLJ), Biozzi ABH Active EAE (MBP, MOG, PLP and peptides)	Relapsing-remitting (SJL, Biozzi) and chronic-progressive (C57BL/6) disease courses with demyelination and axonal damage	No spontaneous disease	Pertussis (toxin) required for many strains, whilst it is often not needed for SJL and some Biozzi EAE models. Higher variability of disease incidence and course, often cytotoxic demyelination in C57BL/6. With rat MBP inflammatory vasculitis with little demyelination
Murine EAE in transgenic mice or knockout mice (mostly C57BL/6 background)	Specifically addresses role of defined immune molecules/neurotrophic cytokines/ neuroanatomical tracts	Most results obtained with artificial permanent transgenic or knockouts	Extensive backcrossing (>10 times) on C57BL/6 background required. Future work with conditional (cre/loxP) or inducible (eg. Tet-on) mutants

Tabelle1: Übersichtstabelle häufig verwendeter EAE Modelle in Nagern: In den verschiedenen Tierstämmen können unterschiedliche Komponenten des komplexen MS Krankheitsgeschehen gezeigt und somit analysiert werden (aus Gold et al., 2006).

1.2 T-Helferzellen und Interleukin 17

1.2.1 Th17 Zellen

In EAE spielen CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle. Lange Zeit wurde angenommen, dass die Effektor T Zellen zwei Populationen bilden, die Th1 und Th2 Zellen (Mosmann et al., 1986). Sie wurden anhand ihres Zytokinprofils unterschieden: Th1 Zellen produzieren TNF α und IFN γ , wohingegen Th2 Zellen IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren. Zur Th1 Differenzierung werden IL-12 und die Transkriptionsfaktoren STAT4, STAT1 und T-bet benötigt. Für die Th2 Differenzierung IL-4 und die Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA3 (Abb.5). Th1 Zellen führen zur zellulären Immunreaktion um intrazelluläre Pathogene auszulöschen, wohingegen Th2 Zellen zur humoralen Immunreaktion führen und Parasiteninfektionen kontrollieren. Lange Zeit wurde angenommen, dass autoreaktive CD4⁺ T-Zellen, die spezifisch für das Myelin Antigen sind, zu Th1 Zellen differenzieren und für EAE und MS verantwortlich sind, weil myelinspezifische T-Zellen in EAE IFN γ produzieren. Da zur Differenzierung von Th1 Zellen IL-12 benötigt wird, sollte es zu einer Hemmung von EAE

kommen, wenn IL-12 blockiert wird. IL-12 ist ein Heterodimer, das aus einer p35 und einer p40 Untereinheit besteht. p35 defiziente knockout Mäuse sind aber sensitiv für EAE, wohingegen p40 defiziente Mäuse resistent sind (Becher et al., 2002). Somit schied IL-12 als Trigger aus und es wurde nach Alternativen gesucht. IL-23 ist ebenfalls ein Heterodimer. Es enthält ebenfalls eine p40 Untereinheit und besitzt zusätzlich eine p19 Untereinheit. IL-23p19 Mäuse sind resistent gegenüber EAE (Cua et al., 2003). Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass IL-23 eine essentielle Rolle bei EAE spielt.

Es konnte gezeigt werden, dass T-Zellen nach IL-23 Stimulation große Mengen an IL-17A und F ausschütten (Aggrawal et al., 2003) und dass diese T-Zellpopulation wichtig für die Pathogenese in EAE ist (Betelli et al., 2007). Zwei Gruppen (Harington et al., 2005, Park et al., 2005) konnten zeigen, dass es sich bei diesen T-Helferzellen um eine eigene, von Th1 und Th2 Zellen unterschiedliche Population handelt. Diese wurde Th17 genannt. Die Entwicklung zu Th17 Zellen aus naiven T-Zellen wird durch $\text{IFN}\gamma$ und IL-4 gehemmt, wohingegen schon gebildete Th17 Zellen nicht durch Th1 oder Th2 Zytokine gehemmt werden. Unter Bedingungen, die zur Th1 oder Th2 Polarisation führen, induziert IL-23 keine Th1 oder Th2 Differenzierung. Zur Th17 Differenzierung wird $\text{TGF}\beta$ und IL-6 benötigt, sowie der Transkriptionsfaktor $\text{ROR}\gamma\text{t}$. Zur Aufrechterhaltung und Expansion der Zellpopulation ist IL-23 essentiell (Abb.6). Die Th17 Zellen spielen in Autoimmunerkrankungen (Martinez et al., 2008) wie rheumatische Arthritis (Pernis, 2009), Morbus Crohn (Monteleone et al., 2009) und MS/EAE (Cua et al., 2003) eine Rolle. Obwohl ihre genaue Aufgabe bei der Abwehr von Erregern noch unklar ist, nimmt man an, dass sie an der Abwehr bestimmter Bakterien und Pilze beteiligt sind. Sie schütten IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-6 und GM-CSF, sowie Chemokine wie CCL20 aus (Dong, 2008).

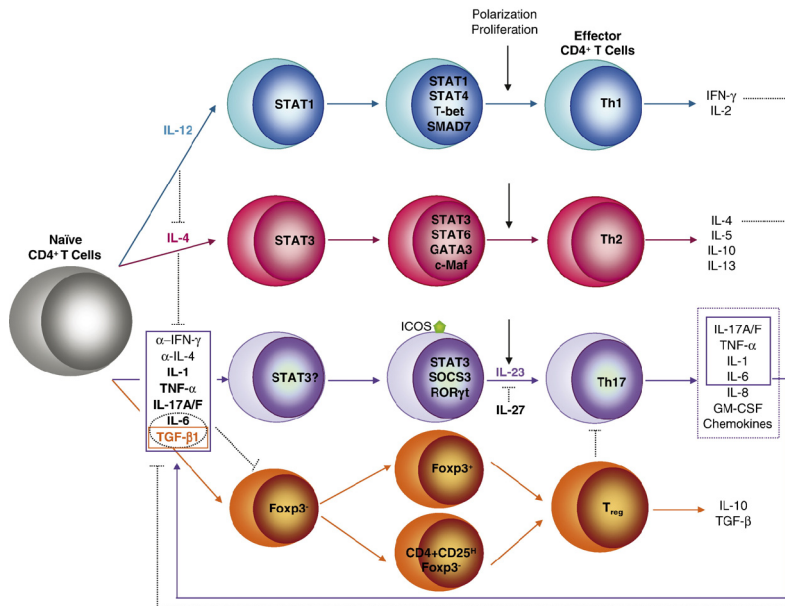


Abb.5: T-Zelldifferenzierung: aus naiven T-Zellen bilden sich durch verschiedene Zytokinstimulationen und Expressionsfaktoren Th1, Th2, Th17 und T_{reg} Zellen, die charakteristische Zytokine ausschütten (aus Furuzawa-Caballeda et al., 2007).

1.2.2 Interleukin 17

Interleukin 17 bildet eine Familie von proinflammatorischen Zytokinen IL-17A-F, wobei IL-17E nun in IL-25 umbenannt wurde und nicht mehr zur Familie zählt. Die Familie ist charakterisiert durch einen pseudo-Cystin Knoten, der durch zwei β-Faltblätter gebildet wird, welche durch Disulfidbrücken verbunden sind (Abb.6). Außerdem ist die C-terminale Aminosäuresequenz aller Mitglieder sehr ähnlich (Kolls, Linden, 2004).

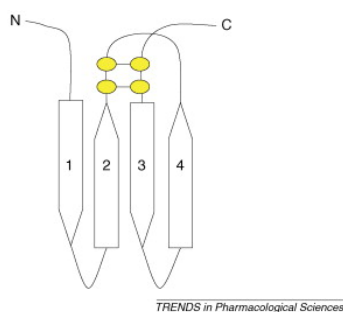


Abb.6: Schematische Darstellung der Struktur der Interleukin 17 Familie: Zwei β-Faltblätter sind durch Disulfidbrücken verbunden (aus Ivanov, Linden, 2009).

IL-17A und IL-17F sind am besten charakterisiert und sind sich auch am ähnlichsten. Da in der vorliegenden Arbeit IL-17A eine Rolle spielt, werde ich mich im Folgenden auf IL-17A beschränken.

IL17A ist ein homomeres Glykoprotein, das aus 155 Aminosäuren besteht und 35kDa schwer ist (Kolls, Linden, 2004). Es wurde 1993 erstmals beschrieben (Rouvier et al., 1993).

IL-17A ist ein proinflammatorisches Zytokin, das die Produktion weiterer Zytokine und Chemokine wie IL-8, monocyte chemoattractant protein 1(MCP-1) und Groα stimuliert.

Infolgedessen werden Monozyten und Neutrophile rekrutiert. Außerdem stimuliert es die Produktion von granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) und granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). Diese Faktoren stimulieren ihrerseits myeloide Zellen. Stimulation von IL-6 und PGE2 verstärkt das entzündliche Umfeld. Die Induktion von ICAM durch IL-17A führt zu weiteren T-Zellaktivierungen (Aggarwal, Gurney, 2002).

IL-17A wird hauptsächlich von den Th17 Zellen produziert. Allerdings kann es auch von CD8⁺ Zellen, $\gamma\delta$ T Zellen, natürliche Killerzellen, Granulozyten und LTi Zellen (lymphoid tissue inducer) gebildet werden (Ivanov, Linden, 2009).

1.2.3 IL-17A Rezeptor

Vergleichbar mit der IL-17 Familie, lassen sich auch ihre Rezeptoren in einer Familie zusammenfassen. Sie setzt sich aus den Rezeptoren IL-17R A-E zusammen. IL-17RA und IL-17RC bilden einen heterodimeren Komplex (Wright et al., 2008). IL-17A und IL-17F binden an einen gemeinsamen Rezeptor IL-17RA. Dieser ist ein Typ I Transmembranprotein mit einer 293 Aminosäuren großen extrazellulären Domäne, 21 Aminosäuren in der Transmembrandomäne und einem 521 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Teil (Yao et al., 1997). Der IL-17A Rezeptor wird fast ubiquitär in den meisten Zellarten exprimiert. Eine besonders starke Expression zeigt sich in haematopoetischem Gewebe.

1.2.4 IL-17A Signalweg

Nachdem IL-17A an den Rezeptor gebunden hat, können zwei verschiedene intrazelluläre Signalwege angeschaltet werden. Der erste beinhaltet das Adapterprotein Nuclear factor (NF)- κ B activator 1 (Act-1). Koimmunopräzipitationen haben gezeigt, dass Act-1 und IL-17RA einen Komplex über die SEFIR Domäne des Rezeptors bilden (Chang, 2006). Daraufhin werden TRAF6, TRAF3 und transforming growth factor activated kinase (TAK)1 aktiviert. Diese wiederum aktivieren Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)- β und C/EBP- γ (Linden, 2007) (Abb.7A). Außerdem sind Mitglieder der MAP (mitogen activated protein) Kinasen, wie c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK) und p38 in die IL-17A vermittelten Zytokinausschüttung involviert (Kolls, Linden, 2004).

Der zweite beschriebene Signalweg ist Act-1 unabhängig. An ihm ist die Janus Kinase (JAK)1 und die Phosphatidylinositol 3 Kinase (PtdIns3K) beteiligt, gefolgt von einer

Inaktivierung der Glykogen Synthase Kinase (GSK)3 β und Genaktivierung (Huang et al, 2007) (Abb.7B).

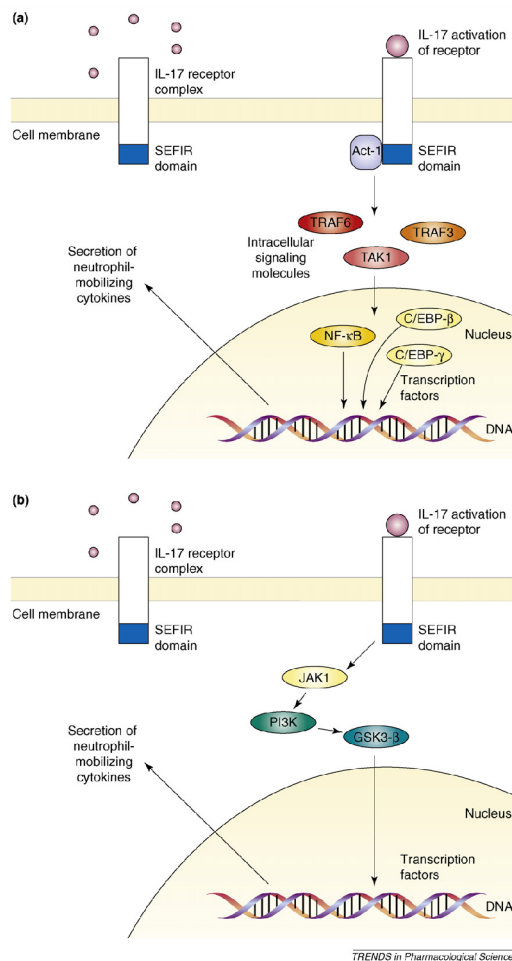


Abb.7: Intrazelluläre Signalwege nach IL-17A Bindung: Sowohl über das Adapterprotein Act1 und die Transkriptionsfaktoren TRAF3 und TRAF6 (A), als auch Act1 unabhängig (B) über die JAK1 Kinase kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (aus Ivanov, Linden, 2009).

1.2.5 IL-17A in MS und EAE

Erhöhte IL-17A mRNA und Protein Expression wurden im Blut und in mononuklearen Zellen der Zerebrospinalflüssigkeit von MS Patienten gefunden (Matusevicius et al., 1999). Außerdem konnten erhöhte IL-17A mRNA Werte in chronischen (Lock et al., 2002) und akuten (Tzartos et al., 2008) MS Läsionen gefunden werden. Dort wurde die IL-17A mRNA nicht nur in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sondern auch in Astrozyten und Oligodendrozyten gefunden.

Auch in Lymphozyten von Tieren mit EAE ist IL-17A erhöht (Zhang, 2003). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Th17 Zellen essentiell für die Induktion von EAE sind. IL-23^{-/-} knockout Mäuse sind vollständig resistent (Langrish et al., 2005). Außerdem sind die klinischen Symptome in IL-17^{-/-} Mäusen stark reduziert (Komiyama et al., 2006). Mit IL-17^{-/-} CD4⁺ T-Zellen kann EAE nicht passiv induziert werden (Komiyama et al., 2006). Wenn EAE Mäuse mit neutralisierendem anti-IL-17 Antikörper behandelt werden, sind sie teilweise geschützt (Langrish et al., 2005, Uyttenhove, Snick 2006). Andererseits wurde aber auch gezeigt, dass die Überexpression von IL-17A in T-Zellen nicht zu einem stärkeren EAE Krankheitsverlauf führt (Haak et al., 2009). Außerdem konnte dieselbe Gruppe zeigen, dass IL-17F^{-/-} Mäuse, auch wenn zusätzlich noch IL-17A neutralisierende Antikörper verabreicht werden, nicht resistent gegenüber EAE sind. So hat die Blockade von IL-23 vielleicht noch andere Auswirkungen, außer der fehlenden Sekretion von IL-17A, die essentiell für die Entwicklung von EAE sind. Auch sekretieren Th17 Zellen außer IL-17A und F weitere Zytokine wie IL-6, IL-22 und GM-CSF (Weaver et al., 2007). Diese könnten den Effekt kompensieren, wenn IL-17A und F nicht vorhanden sind.

1.3 Blut-Hirnschranke (BHS)

1.3.1 Verlust der Bluthirnschrankenintegrität bei Multipler Sklerose

T-Zellen wandern, wie bereits erwähnt, nach EAE Induktion und während der MS Pathogenese in das ZNS ein. Dafür müssen sie die Blut-Hirnschranke (BHS) durchqueren. Der Verlust der BHS-Integrität ist ein früher und wichtiger Schritt in der Pathogenese von MS und EAE, der seit den frühen 1960er Jahren bekannt ist (Broman 1964). Mit Hilfe der MRI (magnetic resonance imaging) Technik konnte gezeigt werden, dass der BHS Zusammenbruch den klinischen Symptomen voraus geht (Kermode et al., 1990). Auch im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass die Integrität der BHS stark beeinträchtigt ist (Fabis et al., 2007).

1.3.2 Aufbau der BHS

Die BHS wird durch spezialisierte Endothelzellen des ZNS gebildet. Im Gegensatz zu den fenestrierten Endothelzellen der Peripherie, sind die Endothelzellen im ZNS durch sogenannte tight und adherence junctions dicht miteinander verbunden (Abb.8). Sie werden umgeben von

den Endfüßchen der Astrozyten und von Perizyten. Außerdem befinden sich Mikroglia und Neurone in der perivaskulären Einheit. Die BHS verhindert den freien Austausch von Substanzen des Blutes mit denen innerhalb des ZNS.

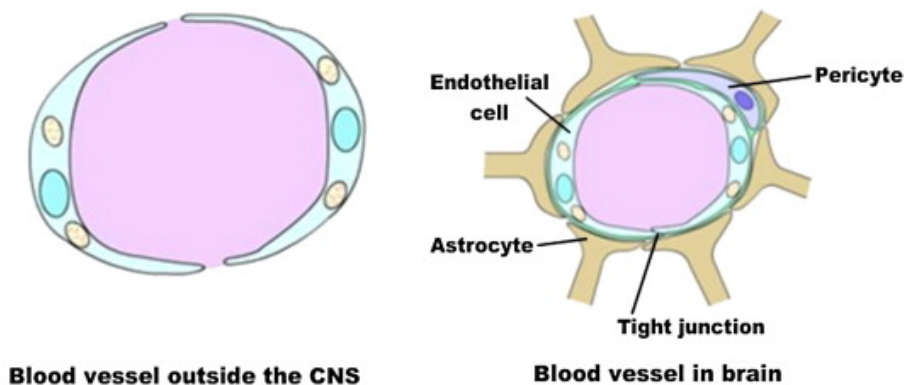


Abb.8: Schematische Darstellung von gefäßbildenden Endothelzellen in der Peripherie (links) und im ZNS (rechts): In der Peripherie sind die Endothelzellen fenestriert, was zu einem freien Austausch von Stoffen zwischen Blut und Gewebe führt. Im ZNS sind die Endothelzellen durch tight junctions verbunden. Der Austausch von Stoffen erfolgt über Transporter. Die Endothelzellen sind dicht von Perizyten und Astrozytenendfüßchen umgeben (aus Palmer, 2010).

1.3.3 Endothelzellen im zentralen Nervensystem

Wie erwähnt unterscheiden sich Endothelzellen im ZNS von denen in der Peripherie. Sie haben keine Fenestrierung, nur minimale Pinozytoseaktivität und sie besitzen tight junctions (Hawkins, Davis, 2005). Außerdem besitzen sie mehr Mitochondrien, da sie für die Transportvorgänge viel Energie benötigen. Da kein freier Transport stattfindet, sind viele Transporter in den Endothelzellen lokalisiert um die Homeostase im ZNS konstant zu erhalten.

Tight junctions (TJ) stellen dichte Barrieren zwischen den Endothelzellen dar. Sie begrenzen den parazellulären Transport von hydrophilen Molekülen über die BHS. Zusammen mit den adherens junctions bilden sie einen festen Gürtel zwischen den Endothelzellen und trennen die luminal Seite von der abluminalen Seite. Nur Moleküle kleiner als 180Da können noch parazellulär transportiert werden (Mitic, Anderson, 1998). Die wichtigsten TJ Moleküle sind Claudine, Occludin und JAM (junction adhesion molecules). Die zytoplasmatischen Regionen dieser Proteine sind an intrazelluläre Gerüstproteine gekoppelt, die wiederum an das Aktin Zytoskelett gebunden sind (Abb.9). Kommt es zu einer Delokalisation der TJ Moleküle weg

von der Plasmamembran oder zu einer Herabsetzung ihres Expressionslevels, führt das zu einem Verlust der Schrankenintegrität.

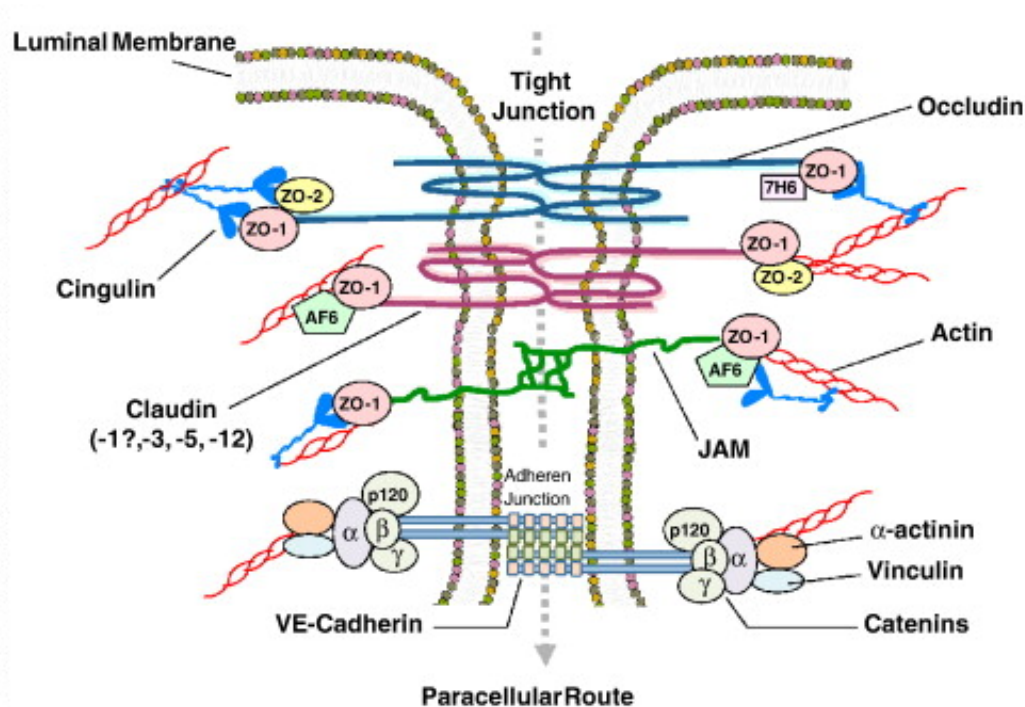


Abb.9: Tight junction: Endothelzellen werden durch verschiedenen Moleküle, die zusammen die tight junctions bilden, eng verbunden. Wichtige Moleküle sind Occludin, die Claudine und JAM, die über Adapterproteine wie ZO an das Cytoskelett gebunden sind. Einen weiteren dichten Verbindungsgürtel bilden die Cadherine der adherens junctions (aus Sandoval, Witt, 2008).

Occludin ist ein Molekül, das die Membran viermal durchspannt und in hohen Konzentrationen in TJs vorkommt. Es bildet Homomere und ist ein kritisches Regulatorprotein, das auf akute Änderungen in der vaskulären Dynamik, wie z.B. bei Entzündungen, reagiert. Der C-Terminus bindet an ZO (zonula occludens) Proteine, die ihrerseits an das Aktin-Cytoskelett gebunden sind.

Claudine bilden eine sehr große Familie. Sie interagieren durch zwei extrazellulären Schleifen mit den Claudinen benachbarter Endothelzellen. Auch sie binden intrazellulär an ZO-Proteine.

JAMs haben nur eine Transmembrandomäne. Sie binden über Disulfidbrücken ihrer Ig-ähnlichen Domäne aneinander. Intrazellulär sind sie an ZO Proteine, PAR3 und MUPP1 gebunden (Ebnet et al., 2003).

Zytoplasmatische Proteine, die am Aufbau und der Regulation der TJs beteiligt sind, beinhalten ZO Proteine, Cingulin, 7H6 und AF-6 (Hawkins, Davis, 2005). Die wichtigsten sind die ZO Proteine, die drei PDZ Domänen, eine SH3 und eine Guanylyl-Kinase-artige Domäne enthalten. Diese sind für die Proteinbindung verantwortlich um die Moleküle an der Plasmamembran zu halten. Der C-Terminus ist für die Bindung an das Aktin Cytoskelett verantwortlich.

Aktinfasern sind essentiell für die Stabilisierung der TJs an der BHS (Lai et al., 2005). Sie halten die Infrastruktur aufrecht, die nötig ist um die Morphologie und Funktion der Zellen zu erhalten. Im Zusammenhang mit entzündungsfördernden Stoffen, oxidativem Stress und Neutrophilen wurden Veränderungen in der Verteilung von Aktin und Polymerisation zu Stressfasern gezeigt. Die führt zu einer erhöhten Permeabilität der BHS (Hixenbaugh 1997, Lum, Roebuck 2001).

Adherens junctions bilden einen Gürtel direkt unterhalb der TJs wodurch sie diese stabilisieren. Sie werden durch homophile Interaktionen zwischen Cadherinen gebildet (Sandoval, Witt, 2008).

1.3.4 Perizyten

Perizyten bedecken einen großen Teil der abluminalen Seite der Endothelzellen und tragen so zu deren Stabilität bei. Sie regulieren die Permeabilität und den Aufbau der Endothelzellen, tragen zu deren Versorgung bei und kommunizieren mit verschiedenen Endothelzellen. Durch ihre kontraktilen Fähigkeiten regulieren sie den Blutfluss (Nakagawa et al., 2009).

1.3.5 Astrozyten

Wie erwähnt bedecken die Endfüßchen der Astrozyten große Gebiete der Endothelzellen. Astrozyten gehören zu den Gliazellen. Es wurde gezeigt, dass Astrozyten für die Bildung und Aufrechterhaltung der BHS nötig sind (Abbott et al., 2006). Außerdem sind sie an der Regulation des lokalen Blutflusses beteiligt (Koehler et al., 2006). Sie sezernieren Faktoren wie TGF β , FGF, glial-derived neurotrophic factor und Angiopoetin-1, die die TJ Bildung und den BHS Phänotyp der Endothelzellen unterstützen.

1.3.6 Das ZNS als immunpriviligierter Raum und der Eintritt von Lymphozyten

Es hat sich gezeigt, dass das ZNS Parenchym ein immunpriviligierter Raum ist. Wird fremdes Gewebe in das ZNS transplantiert, wird es nicht abgestoßen (Backes et al., 1990). Sowohl das adaptive als auch das angeborene Immunsystem sind im ZNS nur sehr begrenzt vorhanden. Andererseits ist die BHS unter physiologischen Bedingungen für Pathogene, für Proteine der unspezifischen humoralen Immunantwort und für Antikörper undurchlässig (Risau et al., 1990).

Bei MS und EAE bekommen aber Immunzellen der Peripherie Zugang zum ZNS Parenchym. Interaktion der zirkulierenden immunokompetenten Zellen mit den Endothelzellen der BHS ist ein kritischer Schritt in der Pathogenese. Dies wird durch ein mehrstufiges Verfahren, in das verschiedene Signal- und Adhäsionsmoleküle involviert sind, realisiert (Abb.10). Zuerst kommt es zu einem transienten Kontakt zwischen Immunzelle und Endothelzelle, der durch Selektine und Integrine vermittelt wird. Der zweite Schritt ist das sog. „Rolling“. Die Leukozyten rollen an der Endothelzellwand entlang und verringern dabei ihre Geschwindigkeit. Dadurch kann der Leukozyt an Chemokine binden, die an der Endothelzelloberfläche präsentiert werden. Dies führt zu einem G-Protein vermittelten Signal in den Leukozyten, mehr Integrine an die Oberfläche zu verlagern und somit deren Avidität zu erhöhen. Diese Bindung ist dann stark genug, um dem Leukozyten die Möglichkeit zu geben zu der Endothelzelle zu kriechen („Crawling“). Es kommt zur Bindung über endotheliale Liganden der Ig Superfamilie und schließlich zur Diapedese der Leukozyten (Engelhardt, 2008).

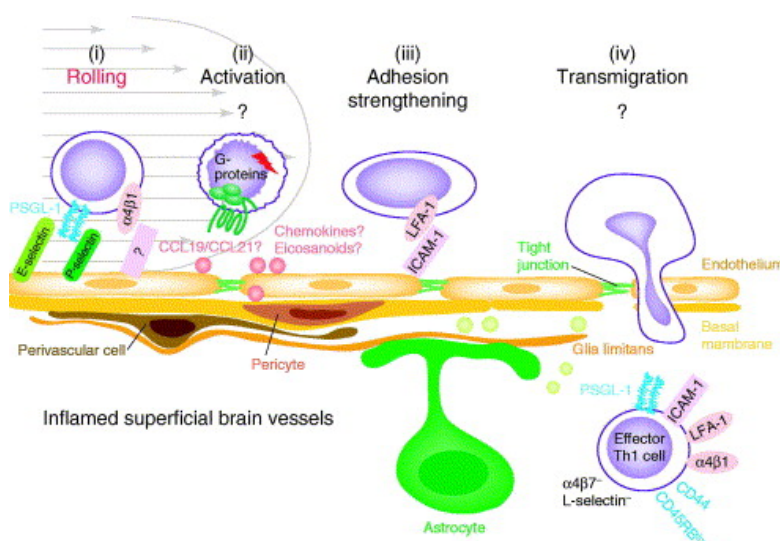


Abb.10: Mehrstufiger Prozess der Adhäsion eines Leukozyten an eine Endothelzelle: „Rolling“ um die Geschwindigkeit zu vermindern, dann vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche, die eine starke Adhäsion ermöglichen. Anschließend kommt es zur Transmigration (aus Engelhardt, Ransohoff 2005).

Es ist nicht vollständig geklärt, ob die Leukozyten die Endothelzellen durchqueren oder ob sie parazellulär die BHS durchbrechen (Abb.11) oder ob beide Wege vorkommen (Engelhardt, Wolburg, 2004).

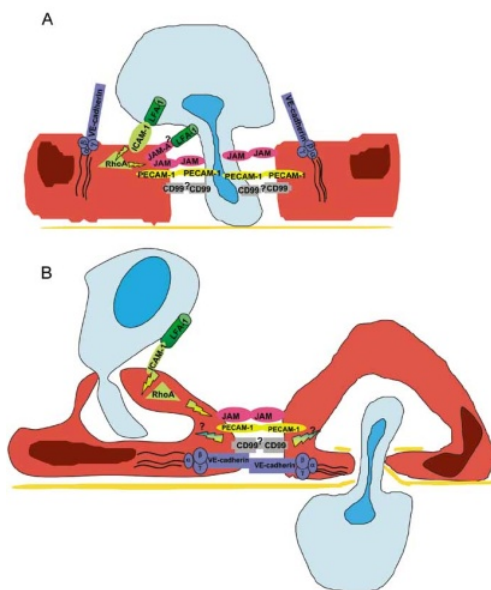


Abb.11: Transmigration eines Leukozyten durch die BHS: Es ist ungeklärt, ob die Transmigration parazellulär (A) oder durch die Endothelzellen (B) erfolgt (aus Engelhardt, Wolburg, 2004).

Es wurde gezeigt, dass Th17 Zellen über die BHS wandern und dass durch IL-17A und IL-22 die BHS Permeabilität erhöht wird, indem TJ zerstört werden (Kebir et al., 2007).

Um den Eintritt der Leukozyten zu erleichtern, sezernieren Leukozyten MMPs. Die Basallamina der Endothelzellen wird angegriffen, was zur proteolytischen Zersetzung der BHS führt (Yurchenco, Schittny, 1990). Es wurde gezeigt, dass Ratten mit EAE eine erhöhte mRNA Expression von MMP3, 7 und 9 haben (Clements et al., 1997, Dasilva, Yong, 2008). Andererseits konnten die klinischen Symptome von EAE durch die Gabe von MMP Inhibitoren abgemildert werden (Liedtke et al., 1998). Auch in MS Patienten wurden erhöhte Werte der MMPs im CSF gefunden (Leppert et al., 1998).

1.3.7 Matrixmetalloproteinasen

MMPs sind eine Untergruppe von Metzincin Proteasen (Parks et al., 2004). Es existieren 25 Mitglieder der MMP Familie. Dies sind extrazelluläre Enzyme, die Proteine der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Kollagen, Elastin, aber auch Ektodomänen von Membranproteinen spalten können. So lassen sie sich nochmals in 4 Gruppen unterteilen:

- Kollagenasen (MMP1= intestinale Kollagenase, MMP8= neutrophile Kollagenase)
- Stromelysine, welche die meisten ECM Moleküle angreifen (MMP3, MMP10, MMP7= Matrylisin)

- Gelatinasen, die ebenfalls viele Komponenten der Basallamina wie Fibronectin, Laminin und Heparinsulfat (MMP2, MMP9) angreifen.
- Außerdem sind Membran-Typ Metalloproteinasen bekannt (MT-MMPs).

MMPs werden als Pro-Enzyme sekretiert und mittels Spaltung durch Plasminogenaktivatoren, Trypsin, andere MMPs oder Oxidation aktiviert.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass MMPs auch an der Zerstörung der Myelinscheide beteiligt sind (Gibjels et al., 1993). In diesem Fall werden MMPs meist von Mikroglia und Astrozyten sezerniert.

1.3.8 Einfluss des kontraktile Apparats auf die BHS-Integrität

Wie oben beschrieben wurde, ist das Zytoskelett wesentlich an der Aufrechterhaltung der BHS-Integrität beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des kontraktile endothelialen Apparates zur Öffnung der BHS führt (Haorah et al., 2005, Kuhlmann et al., 2007). Die TJ werden durch die Disorganisation und Kontraktion des Zytoskeletts zerstört. In den Endothelzellen befinden sich kontraktile Elemente wie Aktin und Myosin, sowie andere regulatorische Proteine (Schnittler et al., 1990). Die Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins (MLC, LC₂₀) führt zur Aktivierung der kontraktile Elemente (Abb.12). Der Phosphorylierungsstatus wird durch die MLC-Kinase (Taylor, Stull, 1988) bzw. Phosphatase (Hartshorne et al., 2004) reguliert. Die MLC-Kinase ist eine Serin/Threonin Proteinkinase. Ihre Aktivität ist Ca²⁺-Calmodulin gesteuert, also vom intrazellulären Kalziumsignal abhängig und wird durch eine hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration aktiviert. Die aktive MLCK phosphoryliert MLC am Serin 19, was dazu führt, dass die Aktin-Myosin ATPase aktiviert wird und das γ -Phosphat von ATP auf Myosin übertragen wird. Die freigewordene Energie wird in mechanische Energie umgewandelt und es kommt zur Kontraktion. Zur Relaxation kommt es durch die Dephosphorylierung der MLC (Ihara, MacDonald, 2007).

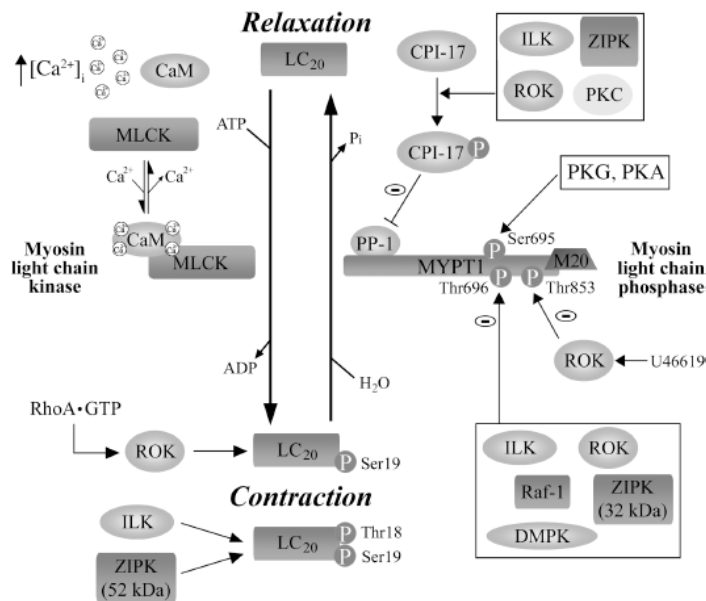


Abb.12: Aktivierung der leichten Kette des Myosins durch Phosphorylierung: Durch die Ca^{2+} -abhängige MLC-Kinase wird die leichte Kette des Myosins phosphoryliert. Dies führt zur Kontraktion des Zytoskeletts (aus Ihara, MacDonald, 2007).

Es existiert ein pharmakologischer Inhibitor der MLCK, das ML-7 (1-(5-Iodonaphthalene-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine HCl) (Abb.13). Dieses wurde in verschiedenen Studien eingesetzt, um die Öffnung der BHS in Zellkulturmodellen wie auch *in vivo* zu verhindern (Kuhlmann et al., 2007, Haorah et al., 2005).

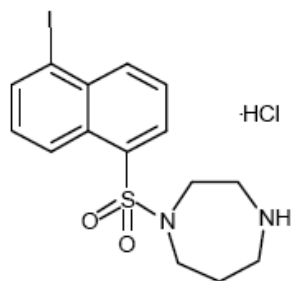


Abb.13: Strukturformel des MLCK Inhibitors ML-7 (aus biomol Datenblatt).

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

1.4.1 Beteiligung der reaktiven Sauerstoffspezies an MS und EAE

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind an einigen Mechanismen beteiligt, die der Pathogenese der Multiplen Sklerose zugrunde liegen. ROS wird bei der Interaktion von Immunzellen mit den Endothelzellen produziert. Dies führt zur Zerstörung der TJs, außerdem zur Umordnung des Zytoskeletts und somit zum Integritätsverlust der BHS, woraufhin Leukozyten in das ZNS einwandern können. Andererseits produzieren eingewanderte Lymphozyten große Mengen an ROS was zur Phagozytose von Myelin durch Makrophagen

führt, zur Schädigung von Oligodendrozyten und zu neuronalem und axonalem Schaden. In akuten und chronischen MS Läsionen werden antioxidative Enzyme produziert, die als endogene Verteidigung gegen oxidativen Schaden dienen (van Horssen et al., 2008, Schreibelt et al., 2008). Außerdem wurde gezeigt, dass die Gabe von antioxidativen Stoffen im EAE Modell zu einem vermindertem Krankheitsverlauf und zur Reduktion von eingewanderten Immunzellen über die BHS führt (Schreibelt et al., 2006, Miyake et al., 2006).

1.4.2 Entstehung von ROS

Unter ROS versteht man radikale und nicht-radikale Sauerstoffverbindungen mit einer hohen Reaktionsbereitschaft, wie das Superoxidanion, Wasserstoffperoxid, das Hydroxylradikal, und das Peroxylradikal, aber auch Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxinitrit (Paulsen, Carroll, 2009). ROS entsteht unter physiologischen Bedingungen in relativ kleinen Mengen und kann vom Organismus neutralisiert werden. Diverse Stoffwechsellzyme wie die Cyclooxygenasen, Lipoxigenase, Hämoxygenase, Aldehydoxidase und die Galactoseoxidase, aber vor allem die Enzyme der Atmungskette in den Mitochondrien bilden ROS. Ebenso wird in den Peroxisomen viel ROS produziert. ROS werden vor allem im Herzen, in der Niere und in Endothelien gebildet und fungieren als intrazelluläre Signalmoleküle. Außerdem werden sie in großem Maße von Entzündungszellen, wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen, gebildet um Krankheitserreger zu eliminieren (respiratorischer Burst) (Robinson, 2009). Sie regulieren die Genexpression, den Zellzyklus, Zellüberleben, Wachstum und Alterung, Migration sowie Sekretion diverser Moleküle. ROS oxidiert Cystein-Reste an bestimmten Zielproteinen und kann so z.B. Ca^{2+} - und K^{+} -Kanäle, redoxsensitive Kinasen, wie die Src und Akt Kinase, ebenso Transkriptionsfaktoren wie NF κ B und p53, AP-1 und Phosphatasen wie PTP und MAPK-Phosphatase, aktivieren (Emerit et al., 2004).

Der Organismus hält Mechanismen bereit, durch die er ROS „unschädlich“ machen kann (Emerite et al., 2004). Hierfür stehen einige antioxidative Systeme zur Verfügung, wie die Glutathion Peroxidase, das Thioredoxin, die Superoxid Dismutase und die Katalase (Jones, 2008). Superoxid Dismutase wandelt Superoxid in H_2O_2 um, wohingegen Katalase H_2O_2 in H_2O und O_2 spaltet.

Unter pathophysiologischen Bedingungen entstehen hingegen große Mengen an ROS, vor allem durch die NAD(P)H- und Xanthinoxidase, da die Redoxhomeostase aus dem

Gleichgewicht geraten ist (Förstermann, 2008). ROS aktiviert z.B. proinflammatorische und mitogene Signalwege. Sie führen zur Oxidation von zellrelevanten Molekülen wie Proteinen, Lipiden und DNA.

1.4.3 ROS im ZNS

Das Gehirn verbraucht sehr große Mengen an Sauerstoff v.a. für die ATP-Synthese in Mitochondrien, sodass es leicht zur ROS Produktion kommen kann (Emerit et al., 2004). Andererseits ist das ZNS besonders anfällig für Schäden, die durch ROS entstehen. Durch seinen hohen Lipidanteil besitzt es viele Strukturen die anfällig für die Schädigungen reaktive Moleküle sind. Außerdem besitzt es weniger Antioxidationsmechanismen. Neben dem oben aufgezeigten Mechanismus von ROS in der Pathogenese in MS und der Beteiligung beim Zusammenbruch der BHS spielen ROS in verschiedenen Erkrankungen des ZNS eine Rolle. So wurde z.B. bei Schlaganfall ein Zusammenhang zwischen ROS Produktion und Infarktgröße gezeigt. Auch bei Parkinson gibt es viele Hinweise für die Beteiligung von ROS (Chinta, Andersen, 2008). In Alzheimer Erkrankungen wurde gezeigt, dass Mikroglia ROS produzieren und somit Neurone schädigen und proinflammatorische Signalwege anstoßen (Block, 2008).

Die zwei größten Produzenten von ROS, unter pathologischen Konditionen, sind beschädigte Mitochondrien und aktivierte Mikroglia.

1.5 Mikroglia

1.5.1 Beschreibung von Mikroglia

Mikroglia gehören, wie der Name schon sagt, zu den Gliazellen. Astrozyten und Oligodendrozyten bilden die Makroglia. Mikroglia bilden die stationären Leukozyten im ZNS, die die unspezifische Immunantwort regulieren und auch an der spezifischen beteiligt sind. Sie wurden erstmals von Rio-Hortega 1932 beschrieben (Rio-Hortega, 1932). Im gesunden adulten ZNS werden ruhende („resting“) Mikroglia gefunden. Sie sind durch einen kleinen Zellkörper mit langen ramifizierten Fortsätzen morphologisch charakterisiert und exprimieren auf ihrer Zelloberfläche nur wenige Antigene. Es konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen in ihrer Umgebung „patrouillieren“ und mit ihren Fortsätzen die neuronale Mikroumgebung abtasten (Davalos et al., 2005; Fetler, Amigorena, 2005). ZNS Verletzungen, Ischämie und Entzündungsmarker aktivieren sehr schnell Mikroglia. Als Signalmoleküle

dienen vielfältige Stoffe aus dem Blut, die auf Verletzungen der Gefäße hindeuten (Möller et al., 2006). Auch nach dem Zusammenbruch der BHS gelangen sehr viele Serumfaktoren ins ZNS Parenchym. So dienen z.B. Sphingosin-1-Phosphat (Tham et al., 2003), Immunglobuline (Stangel, Compston, 2001), die Komplementfaktoren (Möller et al., 1997) und Thrombin (Weinstein et al., 2005) als Signalstoffe. Über G-Protein gekoppelte Rezeptoren kommt es zu Zellantworten, die von Proliferation und Migration über Ca^{2+} -Signale bishin zu Zytokinfreisetzung reichen. Mikroorganismen führen ebenfalls zu einer Aktivierung von Mikroglia. So dient Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellwand von Mikroorganismen als starker Signalstoff. Mikroglia schütten inflammatorische Moleküle wie Zytokine oder NO aus (Hanish, 2002). Wenn es zum Tod von Zellen im ZNS kommt, werden Mikroglia weiter aktiviert und werden phagozytotisch aktiv (Streit, 2002). Diese aktivierten Mikroglia schütten viele verschiedene Faktoren aus, die ihrerseits Astrozyten aktivieren. Dadurch wird die Entzündungsreaktion amplifiziert, mehr Mikroglia an den Ort der Verletzung gelockt und Immunzellen aus dem Blutstrom zur Infiltration in das ZNS veranlasst. Andererseits sind Mikroglia auch in der Herabregulierung der Immunantwort beteiligt.

1.5.2 Biologische Antworten aktivierter Mikroglia

Eine der ersten Antworten auf einen Stimulus ist, dass Mikroglia zum Ort der Verletzung oder Entzündung wandern. Viele Chemokine (Cartier et al., 2005), extrazelluläres ATP oder ADP (Honda et al., 2001) und trophische Faktoren wie VEGF (Forstreuter et al., 2002), sowie Änderungen in der extrazellulären Matrix dienen als migrationsfördernde Faktoren (Abb.14). Außerdem kommt es zur Proliferation der Mikroglia. Zytokine wie IL-1 β , IL-4, IFN γ und GM-CSF (Kim, de Vellis, 2005; Suh et al., 2005), aber auch neurotrophische Faktoren wie BDNF und NT-3 (Elkabes et al., 1996) stimulieren die Proliferation. Zur Abwehr von Pathogenen bilden Mikroglia NO und ROS um deren DNA zu schädigen. Allerdings führt das vor allem bei nicht-infektiösen Verletzungen zu dem toxischen Nebeneffekt, dass neuronales Gewebe geschädigt wird (Garden, Möller, 2006).

Mikroglia sind die Phagozyten des ZNS. Sie nehmen Mikroorganismen und fremdes Material auf und präsentieren die Antigene T-Zellen, womit die adaptive Immunantwort gestartet wird. So dienen Mikroglia als APC (antigen presenting cells) des ZNS. Auch apoptotische Zellen und Zelltrümmer werden von Mikroglia entfernt (Stoling, Grune, 2004).

Eine der wichtigsten Funktionen von Mikroglia ist das Aussenden von Signalen an andere Zellen um die inflammatorische Reaktion zu regulieren. Zytokine, wie Interleukine, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$ (Kim, de Vellis, 2005), Chemokine wie $\text{MIP-1}\alpha$, MCP-1 und RANTES (Hanish, 2002) trophische Faktoren wie NGF und BDNF (Honda et al., 1999), als auch kleine Lipide wie Arachidonsäure und Prostaglandine (Minghetti, Levi, 1998) werden ausgeschüttet.

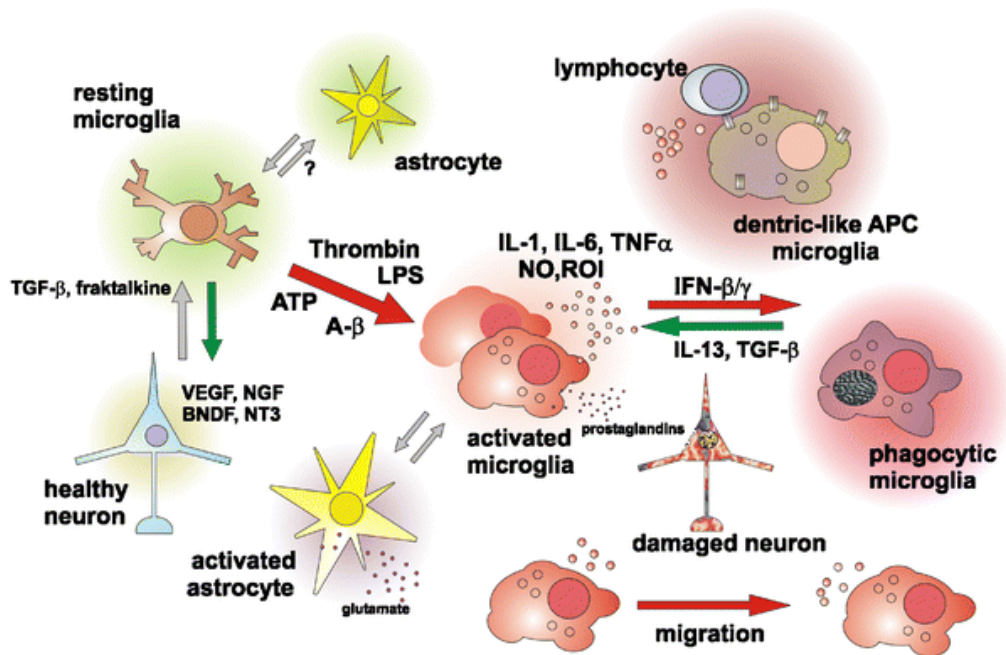


Abb.14: Aktivierung von Mikroglia: ruhende Mikroglia werden durch verschiedene Serumfaktoren, Zytokine und Chemokine aktiviert. Aktivierte Mikroglia schütten inflammatorische Stoffe aus, aktivieren Astrozyten, phagozytieren und präsentieren schädliche Stoffe, migrieren und sekretieren proinflammatorische Substanzen (aus Garden, Möller, 2006).

1.5.3 BV-2 Zellen

Für einen Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine Mikroglia-Zelllinie verwendet. Es handelt sich um die murine, immortalisierte Linie BV-2. Sie wurde 1990 von Blasi et al. generiert, indem primäre Mikrogliazellen in Kultur mit dem *v-raf/v-myc* Oncogen tragenden Retrovirus infiziert wurden. BV-2 Zellen sind semi-adhären wachsende Zellen, bei denen morphologisch, phänotypisch und funktional die Eigenschaften von primären Mikroglia in Kultur erhalten bleiben. Im Allgemeinen eignen sie sich als Modell für aktivierte Mikroglia (Bocchini et al., 1992). Man kann meist zwei Unterpopulationen unterscheiden: adhären flache Zellen mit unterschiedlicher Zellform und kleine, runde Zellen, die nur sehr locker adherieren (Abb.15). Diese entsprechen aktivierten Mikroglia, wohingegen die fest adhären

Population den inaktiven Mikroglia entspricht. Diese Unterschiede lassen sich leicht über den Serumgehalt des Mediums steuern; das im Medium enthaltene FCS führt zur Mikrogliaaktivierung (Laurenzi et al., 2002).

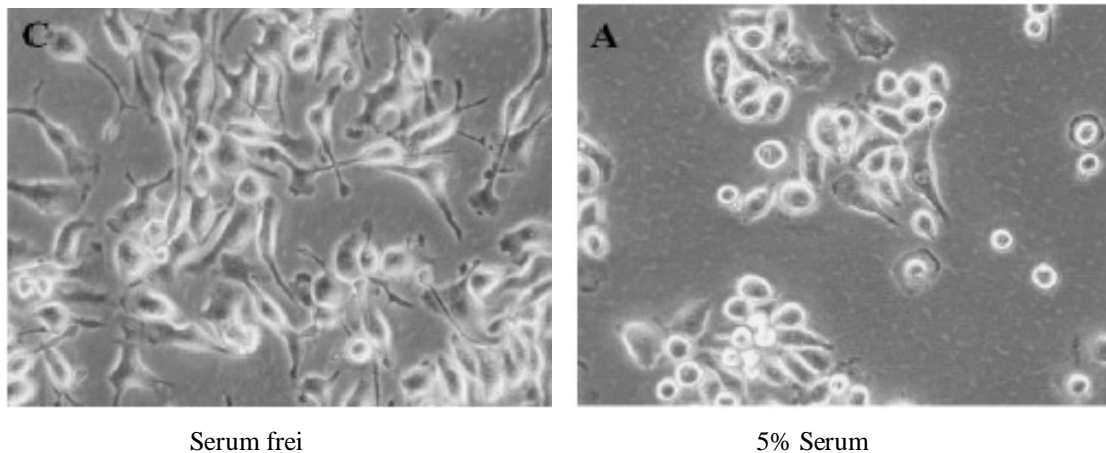


Abb.15: Kultur von BV-2 Zellen: ruhende ramifizierte Mikroglia in serumfreiem Medium (links) und aktivierte kugelförmige Mikroglia in Medium mit 5% Serum (aus Laurenzi et al., 2002).

1.5.4 Mikroglia in EAE und MS

Auch in EAE und MS werden Mikroglia aktiviert. Es wurde gezeigt, dass MHC Klasse I und II auf Mikroglia exprimiert wurden (Konno et al., 1989, Bö et al., 1994) und sie somit als APCs dienen und spezifische $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen generieren. In frühen Stadien sind Mikroglia die Zellpopulation, die hauptsächlich an der Demyelinisierung beteiligt ist, vor allem durch die Ausschüttung von $TNF\alpha$ (Zajicek et al., 1992). Makrophagen aus dem Blut wandern erst später ein (Li et al., 1996). Auch am Zusammenbruch der BHS sind Mikroglia durch die Ausschüttung von MMPs beteiligt (Benveniste, 1996). Wie bereits erwähnt, bilden Mikroglia große Mengen an ROS in MS und EAE und schütten zahlreiche Zytokine und andere proinflammatorische Stoffe aus.

1.5.5 IL-17A und Mikroglia

IL-17A spielt eine bedeutende Rolle bei EAE und MS. Somit liegt es nahe den Zusammenhang zwischen IL-17A und Mikroglia herzustellen. Dies ist Teil der hier vorgestellten Arbeit. Es wurde schon gezeigt dass, Mikroglia den IL-17RA Rezeptor exprimieren (Kawanokuchi et al., 2008). Außerdem zeigten Kawanokuchi auch, dass durch

IL-17A die Expression anderer Zytokine in Mikroglia angeregt werden. Andererseits können auch Mikroglia durch Stimulation mit Zytokinen dazu gebracht werden IL-17A auszuschütten (Kawanokuchi et al., 2008).

1.5.6 Beteiligung von Ca^{2+} an der Mikrogliaaktivierung

Wie oben schon erwähnt, sind auch Ca^{2+} -Signale in die Aktivierungskaskade von Mikroglia involviert. So regulieren intrazelluläre Ca^{2+} -Signalwege viele verschiedene Zellfunktionen wie Proliferation, Gentranskription, Ausschüttung von NO und Zytokinen (Mizoguchi et al., 2009), Migration und den Grad der Verzweigung (Färber, Kettenmann, 2006).

Ca^{2+} kann über viele verschiedene Wege und Rezeptoren in die Zelle gelangen und in sehr viele verschiedene Signaltransduktionswege führen. Die wichtigsten Kanäle sind der NMDA-Rezeptor (N-methyl-D-aspartic acid receptor), der AMPA-Rezeptor (α -amino-3-hydroxy-5methyl-4isoxazolepropionic acid receptor), spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und TRP-Kanäle. Allerdings sind nicht alle Kanäle in jedem Zelltyp und in jeder Entwicklungsstufe des Gehirns zu finden. Spannungsabhängige Kanäle werden im Allgemeinen nur in erregbaren Zellen exprimiert. Außer einem Kalziumeinstrom von außen, kommt es (meist zuerst) zu einer Ausschüttung des Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, vor allem dem endoplasmatischen Retikulum.

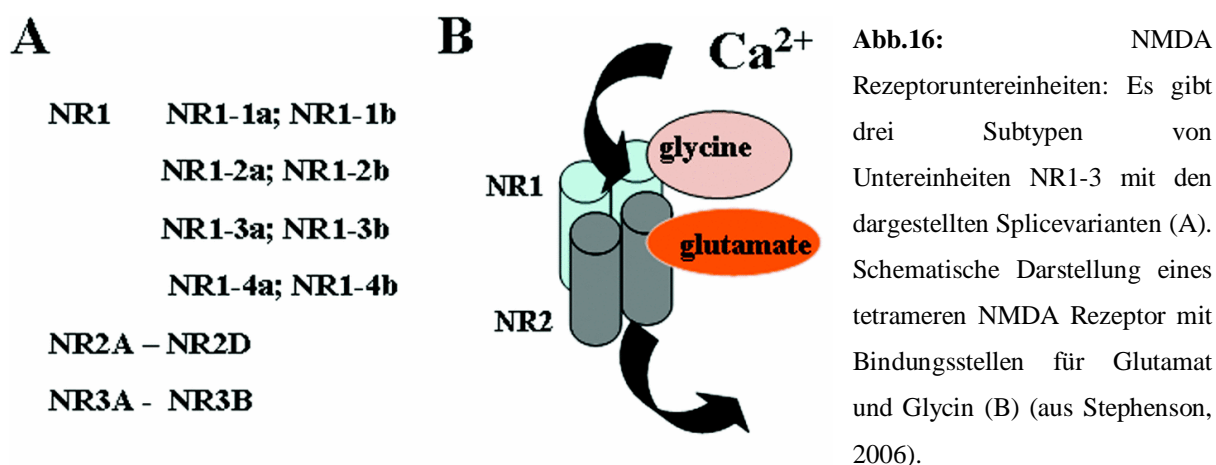
In der hier vorliegenden Arbeit beschäftigte ich mich nur mit dem NMDA-Rezeptor, dessen Ligand Glutamat ist. Nach Glutamatbindung strömen Kalziumionen in die Zelle ein. Deshalb wird im Folgenden näher auf den NMDA Rezeptor eingegangen.

1.5.7 Glutamat-Rezeptortypen und deren Vorkommen

Glutamat ist der häufigste exzitatorischer Neurotransmitter im ZNS. Für Glutamat gibt es mehrere Arten von Rezeptoren: ionotrophische (iGlu) und metabotrophe (mGlu). Die metabotropen Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die iGlu Rezeptoren lassen sich weiter unterteilen in AMPA-Rezeptoren, Kainatrezeptoren und NMDA-Rezeptoren, die Ionenkanäle bilden.

Der NMDA-Rezeptor ist ein spannungs- und ligandengesteuerter Ionenkanal, durch den hauptsächlich Ca^{2+} -Ionen in die Zelle transportiert werden. NMDA-Rezeptoren sind aus drei Familien von Untereinheiten zusammgebaut: NR1, NR2 und NR3, wobei NR2 nochmals in vier Untergruppen eingeteilt werden kann (NR2 A-D) und NR3 in zwei Varianten vorkommt

(NR3A und B) (Abb16A). Die Untereinheitenzusammensetzung ist für die verschiedenen Kinetiken der Rezeptoren verantwortlich. Es bilden sich tetramere Einheiten mit verschiedenen Kombinationen der NR1 und NR2 Splicevarianten. Alle funktionsfähigen NMDA-Rezeptoren beinhalten mindestens eine NR1 Untereinheit, da NR1 für die Rezeptoraktivität benötigt wird (Hollmann, Heinemann, 1994) (Abb.16B). Die NR3 Untereinheit wird vor allem während der Gehirnentwicklung exprimiert (Wong et al., 2002). Außer der Bindungsstelle für Glutamat hat der NMDA-Rezeptor noch eine Bindungsstelle für Glycin. Dieses kann die Wirkung von Glutamat noch verstärken (Forth et al., 1998).



Die Expression und Funktion der NMDA-Rezeptoren in Nervenzellen ist sehr gut erforscht (Stephenson, 2006), wohingegen seine Funktion in nicht-erregbaren Zellen noch weniger erforscht ist. Auf Endothelzellen wurde die Expression und auch der Einfluss auf das BHS-Versagen nachgewiesen (Kuhlmann et al., 2008). NMDA-Rezeptor Aktivierung durch Glutamat führte zu einem erhöhten Schrankenversagen (Betzen et al., 2009). Auch Mikroglia exprimieren den NMDA-Rezeptor (Hiryama, Kuriyama, 2001, Piani et al., 1991).

1.5.8 NMDA-Rezeptor und EAE und MS

Kürzlich wurde gezeigt, dass Mikroglia in aktiven MS Läsionen den NMDA-Rezeptor exprimieren (Newcombe et al., 2008). Wird der NMDA-Rezeptor in EAE Experimenten inhibiert, führt dies zu einem milderen Verlauf von EAE, zur verminderten Öffnung der BHS und auch zu einer geringeren Infiltration von Immunzellen (Bolton, Paul, 1997; Paul, Bolton, 2002; Wallström et al., 1996). Andererseits zeigte eine klinische Studie an MS Patienten, die mit einem NMDA-Rezeptor Blocker behandelt wurden, eine Verschlechterung der Krankheit (Villoslada et al., 2009).

Im Vergleich zu NMDA-Rezeptoren auf Neuronen, scheint ihre Funktion auf nicht-erregbaren Zellen wie Endothelzellen und Gliazellen sehr verschieden zu sein. Gliale NMDA-Rezeptoren zeigen eine hohe Permeabilität für Ca^{2+} und im Gegensatz zu neuronalen NMDA-Rezeptoren nur eine geringe Hemmung durch extrazelluläres Mg^{2+} . Dies könnte ein Hinweis auf die Beteiligung der NR3 Untereinheit sein (Villoslada et al., 2008).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war einerseits *in vivo* an EAE, dem Tiermodell für MS, das IL-17A vermittelte-BHS Versagen zu analysieren und die Auswirkungen des MLC Kinase Inhibitors ML-7 auf die Pathogenese von EAE zu untersuchen. *In vitro* war gezeigt worden, dass ML-7 einen positiven Effekt auf die BHS Integrität hat. Der zugrunde liegende Mechanismus sollte aufgeklärt werden. Andererseits sollten die Effekte von IL-17A auf die Mikrogliazelllinie BV-2 untersucht werden, und gezeigt werden, wie IL-17A zur Aktivierung von Mikroglia beiträgt. Es war bekannt, dass Mikroglia in EAE eine Rolle spielen. Außerdem wurde in den letzten Jahren die essentielle Bedeutung von IL-17 in EAE gezeigt. Deshalb sollte nun ein Zusammenhang zwischen IL-17 und Mikroglia hergestellt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialliste

2.1.1 Chemikalien

100% Ethanol	Roth, Karlsruhe
Alamar Blue (Resazurin Natrium Salz)	Sigma, Deisenhofen
AP5 (Amino-5-phosphonopentanoic acid)	Tocris bioscience, Bristol, UK
Apocynin	Calbiochem, Bad Soden
Aceton	Roth, Karlsruhe
B27	Gibco, Karlsruhe
Bordetella Pertussis Toxin	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Steinheim
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Calcein red-orange	Invitrogen, Karlsruhe
Catalase	Calbiochem, Bad Soden
Chloroform	Sigma, Deishofen
DCFH	Sigma, Deishofen
DEPC Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Gibco, Karlsruhe
Evans Blue	Sigma, Deisenhofen
FCS	Biochrom AG
FITC-konjugiertes LEA-Lektin	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Fluo-3-AM	Invitrogen, Karlsruhe
Fluomount-G	SouthernBiotech, Birmingham, USA
fMLP	Sigma, Deisenhofen
Forene (Isofluran)	Abbott, Ludwigshafen
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutamax	Gibco, Karlsruhe
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Hämacyclor Lösung	Merck, Darmstadt
HBSS	Gibco, Karlsruhe
Hydroethidien	Sigma, Deisenhofen
IL-17A (Maus rekombinant)	Sigma, Steinheim
Immersionöl	Roth, Karlsruhe
Injektionswasser (aqua ad iniectabile)	Braun, Melsungen
inkomplettes Freund-Adjuvans	Sigma, Deisenhofen
isotonische Kochsalzlösung	Delta Select GmbH, München

L-Glutamat	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
MEM	Gibco, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
MK 801	Sigma, Deisenhofen
ML-7	Biomol, Hamburg
MOG ₃₅₋₅₅	Research Genetics, Huntsville, USA
Mycobacterium tuberculosis	Difco, Laboratories, Lawrence, USA
Nagellack	Cosnova, Frankfurt
Narcoren	Merial GmbH, Hallbergmoos
Neurobasalmedium	Gibco, Karlsruhe
PBS	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Percoll	Gibco, Karlsruhe
PFA	Roth, Karlsruhe
Probenecid	Sigma, Deisenhofen
RPMI Medium	Gibco, Karlsruhe
Superoxiddismutase	Calbiochem, Bad Soden
Trichloressigsäure	Sigma, Deisenhofen
Triton X100	Serva, Heidelberg
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Tween20	Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Geräte

-80°C Schrank (Hera freeze)	Heraeus, Hanau
Absaugpumpe	Schego, Offenbach
Binokular	Zeiss, Jena
Boyden Kammer	Neuro Probe, Baltimore, USA
Digitalkamera D100	Nikon, Tokio, Japan
Dumontpinzette (#5,7)	Neolab, Heidelberg
Eismaschine (AF20)	Scotsman, Mailand, Italien
FACS (FACScan)	BD bioscience, Heidelberg
Feinwaage (SBA31)	Scaltec, Göttingen
Hera Cell 400 Inkubator	Heraeus, Hanau
Hera Safe HS 12 Inkubator	Heraeus, Hanau
Infinite F200 Microplate reader	Tecan, Crailsheim
Infinite M1000 Microplate reader	Tecan, Crailsheim

Innova Co-48 Inkubator	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Kaltlichtlampe (KL1500 electronic)	Schott, Bad Gandersheim
Konfokales Mikroskop (BX51WI)	Olympus, Tokio, Japan
Laser	Laser Physics, West Jordan, USA
Light Cyclcer	Roche, Mannheim
Luminex System	Luminex, Oosterhout, Niederlande
Mikroliterspritze	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Mikroskalpell	Medicon,eG, Tuttlingen
Mikroskop (Axioskop)	Zeiss, Jena
Mikroskop (CK40)	Olympus, Tokio, Japan
Mikrotom (CM1325)	Leica, Wetzlar
Neubauer Zählkammer	Brandt GmbH, Wertheim
PCR Maschine (mastercycler personal)	Eppendorf, Hamburg
Perfusionspumpe (Minipuls3)	Gilson Abimed, Düsseldorf
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, (20, 200, 1000 µl) Research	Eppendorf, Hamburg
Schere (micro2000)	Medicon, eG, Tuttlingen
Schüttler (Swip)	Edmund Bühler, Hechingen
Sonifikator (250)	Branson, Dietzenbach
Sterilbank (Biowizard)	Kojair, Vilppula, Finnland
Sterilbank (Herasafe, Heraguard)	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge (5415R)	Eppendorf, Hamburg
Tissue Chopper (McIlwain, TC752)	Mickle Laboratory engeneering, Surrey, UK
Tissue Ruptor	Qiagen, Hilden
Trockenschrank	Kendro, Wien, Österreich
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wasserimmersionsobjektiv (20x, 0,5; 60x,0,9)	Olympus, Tokio, Japan
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenadapter	Roche, Mannheim

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

1 ml Spritzen (Omnifix F)	Braun, Melsungen
1,5 ml Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
15 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
2 ml Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
23G Kanülen	Braun, Melsungen
24 well Platte (flat bottom, clear)	Greiner, Frickenhausen
27G Kanülen	Braun, Melsungen
30G Kanüle (Eclipse needle)	BD, Franklin Lakes, USA

50 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
6 well Platte	Greiner, Frickenhausen
96 well Platten (black, clear flat bottom)	Corning, Kaiserslautern
96 well Platten (flat bottom, clear)	Greiner, Frickenhausen
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Filterspitzen	Starlab, Ahrensburg
Millicell-CM Membran	Millipore, Bredford, USA
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten, 150 mm	Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Nunc, Langenselbold
Pipettenspitzen, 10µl, 200µl, 1ml	Plastibrand, Wertheim
Polycarbonat Membran 5 µm Poren	Neuro Probe Inc, Baltimore, USA
Siebgewebe (Polyamid-Präzisionssiebgewebe, 8 0µm)	VWR, Bruchsal
Sterile serologische Pipetten, 5, 10 und 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen T25	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen T75	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4 Kits

Amplex Red Glutamic acid Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Cyquant NF Cell proliferation assay kit	Invitrogen, Karlsruhe
Cytofix/Cytoperm	BD Bioscience, Heidelberg
Li-cor in-cell-western assay	Li-cor Biosciences, Bad Homburg
Light Cycler Taqman Master Kit	Roche Applied Science, Mannheim
Multiplex Zytokin assay Kit	Luminex, Austin, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Superscript II reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Transcriptor High Fidelity cDNA Sythesis Kit	Roche Applied Science, Mannheim

2.1.5 Software

Adobe Photoshop, Version 6.0	Adobe Systems Inc., München
GraphPad Prism Version 3.02,	Graphpad Software, Inc, San Diego, USA
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/
LightCycler Relative quantification software	Roche, Mannheim
Metamorph Software	Universal Imaging Corporation, Sunnyvale, USA
Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Relative expression software tool (REST) version2	http://www.gene-quantification.de/rest.html
Universal Probe library assay design center	https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=uplct_030000

2.2 EAE Experimente

2.2.1 Tierhaltung

Es wurden Mäuse des Stamms C57/bl6 verwendet. Diese wurden im Tierstall der Universität Mainz unter kontrollierten Bedingungen gehalten und einem 12 Stunden Tag/Nachtrhythmus ausgesetzt. Sie wurden in Gruppen bis zu 5 Tiere pro Käfig gehalten und hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Material von IL-17A^{-/-} Knock-out Mäusen wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe B.Becher (Zürich) zur Verfügung gestellt.

2.2.2 EAE Induktion in C57/bl6 Mäusen und ML-7 Gabe

EAE wurde in 6-12 Wochen alten C57/bl6 Weibchen induziert, indem 50µg MOG₃₅₋₅₅Peptide (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) in komplettem Freund-Adjuvans (CFA) (inkomplettes Freund-Adjuvans (Sigma) ergänzt mit 8 mg/ml hitzeinaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra Stamm, Difco Laboratories)) in die Schwanzbasis subcutan gespritzt wurden. Zum selben Zeitpunkt und nochmals 2 Tage später wurden 200ng Bordetella Pertussis Toxin (Sigma) in PBS intraperitoneal verabreicht.

Zwischen Tag 3 und Tag 12 wurde den Mäusen 2mg/kg Körpergewicht des Myosin Leichtkettenkinase-Inhibitor ML-7 (Biomol) intraperitoneal alle 12 Stunden gelöst in PBS injiziert. Tiere der Kontrollgruppe wurden mit PBS gespritzt (100µl/Injektion).

Die Tiere wurden täglich auf klinische Symptome untersucht. Diese wurden auf einer Skala von 0 bis 6 standardisiert:

0	klinisch unauffällig
1	Verlust des Schwanztonus
2	Gestörter Aufrichtungsreflex
3	Parese der Hinterbeine
4	Paralyse der Hinterbeine
5	zusätzliche Parese der Vordergliedmaßen
6	Tod

Tabelle 2: Skala der klinischen Symptome bei EAE Mäusen

2.2.3 Perfusion

Am Höhepunkt der Erkrankung am Tag 20 wurden die Tiere getötet und zu den verschiedenen Experimenten herangezogen. Die Tiere wurden in Inhalationsnarkose mit Isofluran versetzt. Dann wurde der Thorax geöffnet und das Tier mit ca. 40 ml isotonischer Kochsalzlösung in den linken Herzventrikel perfundiert um das gesamte Blut aus dem Organismus zu entfernen. Sollte das Gewebe für weitere Versuche fixiert werden, wurde das Tier anschließend mit ca. 20 ml Paraformaldehyd (PFA) perfundiert. Entweder wurden Gehirn und Rückenmark sofort entnommen, oder das komplette Tier wurde zur Nachfixierung in PFA für 24 Stunden gelegt. Zur weiteren Konservierung bis zur Versuchsdurchführung konnte das Gewebe in PBS bei 4°C gelagert werden.

2.2.4 RNA Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde aus frisch isoliertem Rückenmark gewonnen. 1 ml Trizol (Invitrogen Life Technologies) wurde pro 100 mg Gewebe zugeben. Es erfolgte eine mechanische Zerkleinerung des Gewebes mit einem „Tissue ruptor“. Um nach der Homogenisierung unlösliches Material wie Lipide, extrazelluläre Membranen oder Polysaccharide zu entfernen, wurde 10 min bei 12000g zentrifugiert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, da RNA bei höheren Temperaturen leicht degradiert wird und die ubiquitär existierende RNasen wie alle Enzyme bei tieferen Temperaturen eine geringere Aktivität haben. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit 0,2 ml Chloroform je initial eingesetztem Milliliter Trizol versetzt, heftig geschüttelt und wieder für 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Es bilden sich zwei Phasen, wobei die obere wässrige Phase, die RNA enthält. Diese wurde vorsichtig so abgenommen, dass die Interphase nicht berührt wird, da in dieser Proteine angereichert werden, die die RNA leicht verunreinigen können. Die RNA wurde mit 0,5 ml Isopropanol pro Milliliter eingesetztem Trizol gefällt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 10 min. Anschließend wurde die RNA mit 75% Ethanol gewaschen, dieses anschließend komplett entfernt und die RNA in RNase freiem Wasser gelöst.

Die RNA Menge und Reinheit wurde photometrisch bestimmt, indem die Absorptionen $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ bestimmt wurden.

2.2.5 Transkription

Die RNA wurde weiter mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen aufgereinigt. Es wurde der Anleitung des Herstellers gefolgt. 1 µg Gesamt RNA wurde zur Transkription eingesetzt. Dies wurde mit dem Kit Transcriptor High Fidelity cDNA Sythesis Kit (Roche Applied Science) durchgeführt. Es wurden „random hexamer“ Primer eingesetzt. Die Transkriptionsreaktion wurde bei 50°C für 30 min durchgeführt, anschließend wurde das Enzym bei 85°C hitzeinaktiviert.

2.2.6 Realtime PCR

Die gewonnene cDNA wurde 1:10 verdünnt. Die realtime PCR wurde mit dem LightCycler TaqMan Master Kit von Roche durchgeführt. Dies basiert auf der Verwendung von Sonden (Universal Probe Library (Roche Applied Science)). Mit Hilfe des webseitenbasierten Universal Probe Library Assay Design Center, wurden für jedes zu untersuchende Gen zwei Primer konstruiert (Tabelle 3). Diese umschließen eine kurze DNA Sequenz, an welche eine fluoreszenzgekoppelte Sonde bindet. Primer und Sonde lagern sich an die denaturierte DNA an. Die eingesetzte Polymerase enthält eine Hydrolysefunktion. So wird während der Elongationsphase die Sonde hydrolysiert. Der Quencher wird vom Fluorophor getrennt und es kommt zur Fluoreszenz der Sonde, die dadurch detektiert wird. Je mehr DNA vorhanden ist, desto stärker ist die Fluoreszenz der Probe. Als Crossing point (Cp) wird derjenige Zyklus der PCR Reaktion definiert, an dem zum ersten Mal das Fluoreszenzsignal stärker als das Hintergrundrauschen ist. Mit der $\Delta\Delta C_p$ Methode wurde die relative Genexpression bestimmt. Bei manchen Proben war dies nicht möglich, weil die Genexpression im Rückenmark der unimmunisierten Tiere unterhalb der Detektionsgrenze war. In diesen Fällen wurden Verdünnungsreihen von Ziel- und Referenzgen gemacht und in die LightCycler® Relative Quantification Software von Roche importiert um das Konzentrationsverhältnis von Ziel- und Referenzgen zu erhalten.

Pro Reaktion wurden 2,5 µl cDNA eingesetzt. Die Reaktion wurde nach der Anleitung des Herstellers im Light Cycler (Roche) durchgeführt. Als Referenzgen wurde β -Aktin verwendet.

Gen	Forward primer	Reverse primer	Sonde
IL-17A	CAGGGAGAGCTTCATCTGTGT	GCTGAGCTTTGAGGGATGAT	74
IL-22	TTTCCTGACCAAACCTCAGCA	TCTGGATGTTCTGGTCGTCA	17
IL-6	TCTAATTCATATCTTCAACCAAGAGG	TGGTCCTTAGCCACTCCTTC	78
IL-1 β	TGTAATGAAAGACGGCACACC	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG	78
GM-CSF	GCATGTAGAGGCCATCAAAGA	CGGGTCTGCACACATGTTA	79
G-CSF	GTGCTGCTGGAGCAGTTGT	TCGGGATCCCCAGAGAGT	17
COX-2	GATGCTCTTCCGAGCTGTG	GGATTGGAACAGCAAGGATTT	102
MCP-1	TCTCTCTTCCTCCACCACCA	GTGGGGCGTTAACTGCAT	19
IFN γ	GGAGGAACCTGGCAAAGGAT	TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGG	21
TNF α	CTGTAGCCCACGTCGTAGC	TTTGAGATCCATGCCGTTG	78
iNOS	TGGAGGTTCTGGATGAGAGC	AATGTCCAAGGAAGTAGGTGAGG	102
MMP2	TGCCATCCCTGATAACCTG	TGACGCTCTTGAGACTTTGG	78
MMP8	AATGGCATTGAGACAATCTATGG	CTCAGGTGGGGGTCACA	107
MMP9	ACGACATAGACGGCATCCA	GCTGTGGTTCAGTTGTGGTG	19
MMP10	GAGTCTGGCTCATGCCTACC	TGCAACCAGGAATAAGTTGGT	81
MMP12	AAGCAGAAATCAACTTTTCCTTTTA	GGGAATATATGCTCCTGGGATAG	21
IL-17RA	TGGGATCTGTCATCGTGCT	ATCACCATGTTTCTCTTGATCG	85
IL-22 R1	CTGTGCAGGGGTCCAGAG	TGAAGGAGACCGGATGTGT	81
NR1	CACTGTGTCTTTTGGTTTTGC	CATTTAGGGCTATCACCTCCA	78
Actin β	TGACAGGATGCAGAAGGAGA	CGCTCAGGAGGAGCAATG	106

Tabelle 3: Verwendete Primer für die Realtime PCR

2.2.7 Konventionelle RT-PCR

Gesamt RNA von ca 2×10^6 Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. 1 μ g RNA wurde zur Transkription mit SuperScriptII Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies) eingesetzt und mit oligo(DT)₁₂₋₁₈ Primer transkribiert.

Die cDNA wurde mit den in Tabelle 4 aufgeführten genspezifischen Primern amplifiziert. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet.

Gene	Forward primer	Reverse primer
IL17RA	GCAGCTGAACACCAATGAGC	GCAGCACCAGTGAAACTTGC
IL-22R1	CCAGCGGATCACCCAGAAGT	ATCGGGCAGCGTCTTCACTC
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TACAGCAACAGGGTGGTGGA

Tabelle 4: Verwendete Primer in der RT-PCR

2.2.8 Evans Blau

Evans Blau wurde als Marker für eine durchlässige BHS verwendet. Die Mäuse bekamen 24h vor dem Töten 1 ml einer 0,4% Evans Blau Lösung in PBS intraperitoneal gespritzt. Nach der Perfusion wurden Gehirn und Rückenmark entnommen, gewogen und bei -80°C eingefroren. Das Gewebe wurde in 1 ml 50% Trichloressigsäure (6,1N, Sigma) homogenisiert und anschließend bei 10000 rpm für 10 min zentrifugiert. Im Überstand konnte man dann die Fluoreszenz des Evans Blau bei einer Anregungswellenlänge von 620 nm und einer Emissionswellenlänge von 680 nm im Tecan Plate reader bestimmen.

2.2.9 Immunzellisolierung und FACS Analyse

Immunzellen wurden mit Hilfe eines Percollgradienten (Gibco) aus dem ZNS am Höhepunkt der Krankheit isoliert. Gehirn und Rückenmark wurden entnommen und homogenisiert. Dann wurde das Gewebe mit Kollagenase und DNase lysiert. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 1500 rpm wurde das Pellet in PBS und Percoll resuspendiert und 30 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Ganz oben im Zentrifugenröhrchen sammelt sich Myelin an. Dies wurde entfernt und nochmals 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Nun wurden die Immunzellen, die sich in der Phase zwischen 30% und 37% Percoll befinden, entnommen und in PBS gegeben. Für die FACS Analyse wurden die Zellen mit anti-CD45, anti-IFN γ (Becton Dickinson) anti-CD11b und anti-IL-17A gefärbt. Intrazelluläre Färbungen wurden nach der Anleitung des Herstellers (Becton Dickinson) mit Cytofix/Cytoperm durchgeführt.

2.2.10 In vivo ROS Messung

Zur *in vivo* Detektion von ROS wurde der Superoxid sensitive Farbstoff Hydroethidin (Sigma) verwendet. Hydroethidin wird durch Superoxid zu Dihydroethidin (DHE) oxidiert und bindet dann an die DNA. 200 µl einer 1µg/µl Hydroethidin-Lösung (in Injektionswasser) wurden intraperitoneal der Maus verabreicht. Nach 15 min wurde das Tier mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert. Rückenmark und Gehirn wurden entnommen und bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde in 4 ml HBSS mit einem „Tissue ruptor“ 3 min lang auf Eis homogenisiert. Anschließend wurden die Proben zur weiteren Homogenisierung dreimal durch eine 27G Kanüle und dreimal durch eine 30G Kanüle gezogen. Darauf folgend wurde das Homogenat durch ein 80 µm Maschensieb filtriert.

2.2.10.1 ROS Detektion im Gesamthomogenat

Um die ROS Menge auf die Zellzahl normieren zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit dem DNA Farbstoff des Cyquant Kits (Invitrogen) gefärbt und anschließend im Tecan Plate reader M1000 gemessen (Anregung 535 nm und 485 nm, Emission 610 nm und 530 nm).

2.2.10.2 ROS Detektion in Endothelzellen

Um die Superoxidproduktion spezifisch in Endothelzellen des ZNS zu detektieren, wurde den Mäusen zusätzlich intravaskulär 100 µg Fluorescein isothiocyanate (FITC)-konjugiertes Lycopersicon esculentum agglutinin (LEA) Lektin (Vector Laboratories) injiziert. Dieses färbt spezifisch Endothelzellen an.

Die Tiere wurden mit 75mg/kg Narcoren (Pentobarbital) intraperitoneal anästhesiert. Die Vena jugularis externa wurde freigelegt und 50µl LEA langsam intravenös appliziert. Nach 15 min erfolgte die Perfusion (s.o.). Das Zellhomogenat wurde im FACS analysiert. Die DHE Fluoreszenz wurde in der DHE/FITC-LEA doppelpositiven Population in relativen Fluoreszenzeinheiten quantifiziert.

2.2.11 Immunhistologie

Von PFA-fixiertem Rückenmark wurde 100 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in PBS gewaschen und mit 10% Serum in 0,5% Triton X-100 blockiert. Über Nacht wurden sie mit dem Erstantikörper inkubiert. Am folgenden Tag wurde wieder zweimal mit PBS für 10 min gewaschen und anschließend mit dem fluoreszenzgekoppelten Antikörper für 2h inkubiert.

Die Präparate wurden am konfokalen Mikroskop (BX 51 WI (Olympus)) mit der Metamorph-Software (QLC100; Visitech) betrachtet und analysiert. Die Fluoreszenzintensität der IgG Färbung wurde im gesamten Aufnahmebereich (bei einer 20 fachen Vergrößerung) gemessen; wohingegen die Fluoreszenzintensität der pMLC und DHE Fluoreszenz nur in definierten Regionen der CD31-pMLC doppelpositiven Mikrogefäßen bei einer 60fachen Vergrößerung analysiert wurde. Die Fluoreszenzintensitäten wurden als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) angegeben.

Antikörper	Eingesetzte Verdünnung	Zweitantikörper
rabbit anti mouse ICAM-1 Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:100	goat anti rabbit-Cy2 Jackson Immunoresearch
goat anti mouse IgG-Alexa568 Invitrogen	1:100	
rabbit anti mouse pMLC Sigma	1:100	goat anti rabbit-Cy2 Jackson Immunoresearch
rat anti mouse CD31 Beckman Coulter	1:100	donkey anti rat-Cy3 Jackson Immunoresearch
goat anti mouse CD68 Santa Cruz Biotechnology	1:100	donkey anti-goat-Dylight488 Santa Cruz Biotechnology Inc.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

2.3 BV-2 Zelleexperimente

2.3.1 Kultivierung der Zelllinie BV-2

Die immortalisierte murine Mikrogliazelllinie BV-2 (interlab cell line collection, Italy) wurde in Zellkulturflaschen T75 (Sarstedt) kultiviert. Das Medium basiert auf Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) (Gibco), ergänzt mit 2 mM L-Glutamin und 10% fötalen Kälberserum (FCS) (beide Invitrogen, Karlsruhe). Die Zellen wurden zwei- bis dreimal wöchentlich gesplittet, d.h. mit Trypsin abgelöst und eine geringere Menge der Zellen wird zur Weiterkultur in einer neuen Flasche ausgesät. Die Zellen sind bis zu einer Passagenzahl von ca. 20 verwendbar. Sie wurden in einem Inkubator (New Brunswick Scientific, Nürtingen, Germany) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.3.2 Trypsinisieren

Alle Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt. Das alte Medium wurde abgesaugt. Da im Medium enthaltenes FCS stark die Aktivität des Trypsins inhibiert, müssen die Zellen erst mit HBSS gewaschen werden. 10 ml HBSS wurden vorsichtig an den Rand der Flasche pipettiert, damit sich die Zellen nicht ablösen. Anschließend wurden 3 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und für ca. 1 min einwirken gelassen. Da die BV-2 Zellen nicht sehr fest adherieren (semiadherent) reicht diese kurze Reaktionszeit. Es wird stark gegen die Zellkulturflasche geklopft, um eine Einzelzellsuspension zu erreichen. Die Reaktion wurde mit 5 ml Medium gestoppt, mehrfach auf- und abpipettiert und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellkulturflasche wurde nochmals mit 5 ml Medium ausgespült um verbliebene Zellen zu lösen. Nun erfolgte eine Zentrifugation von 5 min bei 1000 rpm. Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert. Eine entsprechende Anzahl Zellen wurde in eine neue T75 Flasche überführt, bzw. für Experimente in 96 bzw. 24 well Platten ausgesät.

2.3.3 ROS Detektion *in vitro*

Für die ROS Detektion wurden BV-2 Zellen auf 96 well Platten ausgesät. Eine konfluent mit BV-2 Zellen gewachsene Zellkulturflasche T75 wurde auf zwei 96 well Platten gesplittet und dann für die Experimente der ROS Detektion verwendet. Dabei war der Versuchsablauf etwas verschieden, je nachdem ob es sich um eine kontinuierliche Messung oder eine Endpunktmessung handelte:

2.3.3.1 Kontinuierliche Messung der ROS Produktion

Bildeten die BV-2 Zellen eine konfluente Schicht, wurde das Medium abgenommen und durch HBSS⁺⁺⁺ ersetzt. Dieses besteht aus Hanks balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen) ergänzt durch 10 mM Glucose, 2 mM CaCl₂ und 1 mM MgCl₂ (alle von Merck). Die ROS Produktion wurde mit DCFH ((2',7'-dichlorodihydrofluorescein), Sigma) gemessen. DCFH wird durch ROS zu DCF oxidiert, welches fluoresziert. 10 µM DCFH wurden in HBSS⁺⁺⁺ zu den Zellen geben und 20 min bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde bei 37°C in den Tecan plate Reader gestellt und 5 min jeweils alle 60 Sekunden bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emission von 535 nm gemessen. Nun wurden 1, 10, 50 oder 100 ng/ml IL-17A (Sigma) zugegeben und während einer Stunde alle 5 min ein Wert gemessen.

2.3.3.2 Endpunktmessung ROS Detektion

Am Tag nach dem Aussäen wurde ein Mediumwechsel zu BV-2 Medium, das nur 1% FCS enthält durchgeführt. Dadurch wurde eine Stimulation der Zellen durch Faktoren des Serums verhindert. Die Zellen wurden mit IL-17A (1-100 ng/ml, Sigma) und ggf. den entsprechenden Inhibitoren (Catalase 756U/ml, Superoxiddismutase (SOD) 128U/ml, Apocynin (10 µg/ml), MK 801 10 mM, AP5 30 µM) stimuliert. Nach 24h wurde das Medium durch HBSS⁺⁺⁺, das 10µM DCFH und zur Normalisierung der Zellzahl 1 µM calcein red-orange (Invitrogen) enthält, ersetzt. Die Zellen wurden 30 min bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die ROS Bildung sofort am Tecan Plate reader bei Anregungswellenlängen von 485 nm und 540 nm sowie Emissionen von 540 nm und 595 nm detektiert.

2.3.4 Proliferationsassay

Zellproliferation wurde mit Alamarblue (Resazurin Natriumsalz, Sigma) analysiert. Wird die dunkelblaue, nicht fluoreszierende Substanz in Zellen inkorporiert, wird sie reduziert, rot und hoch fluoreszierend. Somit kann die Zunahme der Fluoreszenz als Maß für die Zunahme der Zellzahl dienen. 2000 Zellen/well wurden in eine 96 well Platte ausgesät. Nach 24h wurde von Kulturmedium auf BV-2 Medium mit nur 1% FCS gewechselt. IL-17A wurde in Konzentrationen von 1, 10, 50 und 100 ng/ml zugeben. Ggf. wurde der NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin bzw. die NMDA Rezeptorinhibitoren MK 801 und AP5 ebenfalls zugegeben. 100 µg/ml Alamarblue wurden direkt ins Medium gegeben und die Zellen für weitere 72 Stunden bei 37°C wachsen gelassen. Jeweils nach 24h wurde die Fluoreszenz bei 535 nm und einer Emission von 595 nm gemessen. Alle gemessenen Werte wurden in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt.

2.3.5 Migration

Untersuchungen zur Zellmigration wurde in einer sog. „Boyden Kammer“ mit 48 wells durchgeführt (Neuro Probe). Die Kammer besteht aus zwei Kompartimenten, die durch eine Polycarbonat Membran mit 5 µm Poren getrennt sind. Wandern Zellen durch die Membran, bleiben sie auf der unteren, matten Seite haften. 30 µl BV-2 Medium mit 1% FCS, die als Stimulans 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml IL-17A enthielten, wurden pro well in das untere Kompartiment gefüllt. Ggf. wurde anti IL-17A (LEAF purified antibody Biolegend 20 ng/ml), bzw. die Isotypkontrolle (LEAF purified rat IgG1 isotype Ctrl) zum Medium hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurde N-Formyl-Metionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP)

(50 μ M, Sigma) verwendet. Die Membran wurde aufgelegt und die zusammengebaute Kammer für 30 min im Brutschrank bei 37°C äquilibriert. Anschließend wurden 50 000 Zellen/well in das obere Kompartiment gefüllt. Hierzu wurde eine T25 Flasche mit konfluent gewachsenen BV-2 Zellen trypsinisiert und in soviel BV-2 Medium, das 1%FCS enthält resuspendiert, dass eine Konzentration von 10⁶/ml Zellen entsteht. Ggf. wurden die Inhibitoren SOD und Apocynin zu der Zellsuspension gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 18h bei 37°C wurde die Kammer auseinander gebaut. Nicht gewanderte Zellen wurden von der Oberseite der Membran durch Abstreichen mit PBS entfernt. Die Membran wurde 20 min getrocknet und 15 min in 100% Methanol fixiert. Nach einem weiteren Trockenschritt wurden die Zellen mit Hämacytometer-Lösung (Merck) angefärbt. Die Membran wurde auf einen Objektträger gelegt und unter Immersionsöl mit einem Deckglas bedeckt. Um das Eindringen von Luftblasen zu vermeiden, wurde das Deckglas mit Nagellack umrandet.

Jedes well wurde mit einer Nikon D100 Digitalkamera fotografiert. Im Computerprogramm Photoshop wurden die Zellen markiert und in ein schwarz-weiß Bild umgewandelt. Mit Hilfe der Software ImageJ konnte die Anzahl der gewanderten Zellen ausgegeben werden.

2.3.6 Kalzium Messung

Intrazelluläres Kalzium wurde mit dem kalziumsensitiven Farbstoff Fluo3-AM-Ester gemessen. Fluo3-AM-Ester wird, sobald es in die Zelle aufgenommen wurde, durch endogene Esterasen zu Fluo3 hydrolysiert. Dieses bindet an Kalzium und wird fluoreszent.

20 000 Zellen/well wurden in eine 24 well Platte ausgesät. Nach zwei Tagen wurde das Medium zu BV-2 Medium mit nur 1% FCS gewechselt. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml IL-17A stimuliert. Ggf. wurde der NMDA-Rezeptor Inhibitor MK 801 zugegeben. Nach 24h wurde das Medium entfernt und durch HBSS⁺⁺⁺ mit 2 mM Probenecid (Sigma) und 10 μ M Fluo-3-AM (Molecular Probes) ersetzt. Es erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 37°C. Anschließend wurde die Fluo-3-AM haltige Lösung entfernt und durch HBSS⁺⁺⁺ mit 2 mM Probenecid ersetzt und nochmals für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das erlaubt die vollständige Hydrolyse des Esters.

Die Platte wurde in den Tecan Plate reader gestellt und für 3 min alle 30 sec bei 485 nm Anregungswellenlänge und 535 nm Emissionswellenlänge gemessen. Nun wurde 1mM L-Glutamat zugegeben und die Fluoreszenz wurde 1 Stunde lang alle 30 sec aufgezeichnet.

2.3.7 Glutamataassay

Die Glutamatausschüttung wurde mit dem Amplex[®] Red Glutamic Acid Kit (Invitrogen) durchgeführt. Hierfür wurden 30 000 Zellen/well in eine 24 well Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel zu BV-2 Medium mit nur 1% FCS. Die Zellen wurden für 1-24 h mit 100 ng/ml IL-17A stimuliert. Der Überstand wurde abgenommen und zentrifugiert, um alle Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. 50 µl wurden für den Assay verwendet. Dieser wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm gemessen.

2.3.8 NMDA-Rezeptordetektion durch In Cell Western

Durch die Technik des In Cell Western können Proteine in den Zellen im Zellkulturplattenformat detektiert werden.

20 000 Zellen/well wurden in einer 96 well Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel zu BV-2 Medium mit 1% FCS und die Stimulierung mit 100 ng/ml IL-17A. Ggf. wurde der Inhibitor MK 801 (10 µM) hinzugefügt. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 20 min mit 4% PFA fixiert. Der In Cell western wurde mit dem Kit von Li-cor Bioscience nach dessen Anleitung durchgeführt. Die Zellen wurden mit 0,1% Triton permeabilisiert und anschließend in Odyssey Blocking Buffer 1,5 h inkubiert. Als Primärantikörper wurde NR1 (GeneTex 1:200) und p-NR1 Ser 896 (Santa Cruz Biotechnology Inc. 1:50) eingesetzt und über Nacht bei 4°C gebunden. Am nächsten Tag wurde mit 0,1%iger Tween20 Lösung (Sigma) gewaschen. Der mit Infrarot-Farbstoff gekoppelte Zweiantikörper Goat anti rabbit IR Dye 800CW wurde 1:800 in Blockierungslösung eingesetzt. Zur Normalisierung über die Zellzahl wurden die Zellfarbstoffe Sapphire700 (1:1000 verdünnt) und Draq5 (1:2000 verdünnt) eingesetzt. Nach einer Inkubation von 1h wurde freier Farbstoff und Antikörper durch 0,1%ige Tween Lösung abgewaschen und anschließend die Fluoreszenz bei Anregungswellenlängen von 650 nm und 780 nm und Emissionswellenlängen von 700 und 800 nm im Tecan Plate reader gemessen.

2.3.9 Zytokinbestimmung mit Luminexassay

Um die Proteinsekretion der BV-2 Zellen zu bestimmen, wurden diese im 6 well Format kultiviert und die entsprechenden Substanzen für 24 h zugegeben. Der Überstand wurde abgenommen und mit Hilfe des Multiplex Zytokin Assay Kits von Luminex analysiert.

2.4 Kortikale organotypische Kulturen

2.4.1 Präparation

Die Präparation wurde nach der Methode von Stoppini (1991) durchgeführt. C57/bl6 Mäuse am postnatalen Tag 3 wurden schnell dekapitiert, das Gehirn entnommen und in MEM⁺ Medium gegeben. Dieses besteht aus Minimal Essential Medium (MEM, Gibco) ergänzt mit 2 mM Glutamin (Invitrogen). Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Bulbus olfactoris wurde entfernt, anschließend wurden die Hemisphären getrennt und Hippocampus, Thalamus und Striatum entfernt. Jede Kortexhemisphäre wurde mit Hilfe eines Tissue Choppers (McIlwain, Mickle Laboratory Engineering) in 350 µm dicke, koronale Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden vorsichtig getrennt und die Hirnhäute entfernt. Die Schnitte wurden so zugeschnitten, dass der dorsolaterale Teil erhalten blieb, der auf Millicel-CM Membranen (Millipore) übertragen wurde. Diese wurden in einer 6 well Platte in 1 ml NB/B27 Medium über Nacht äquilibriert. NB/B27 Medium beruht auf Neurobasal Medium welches durch 2% B27 (Gibco), 2mM Glutamax (Gibco) and 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin ergänzt wurde.

2.4.2 Haltung der Kulturen

Am Tag nach der Präparation (=div1 (days *in vitro*)) und an div3 wurde das Medium gewechselt. Es wird 1 ml Medium in jedes well der 6 well Platte gegeben und darauf die Membran mit den Schnitten gelegt. Somit wachsen die Kulturen an der Grenzfläche. Sie sind nur mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt. Am div3 wurden die Kulturen mit 1, 10 oder 100 ng/ml IL-17A stimuliert und ggf. wurden Inhibitoren ins Medium gegeben.

2.4.3 Immunfärbung

Nach 24 stündiger IL-17A Stimulation wurden die Schnitte mit 100% eiskaltem Aceton bei Raumtemperatur für 10 min fixiert. Anschließend erfolgten immunhistologische Färbungen wie unter 2.2.11 beschrieben, die am konfokalen Mikroskop analysiert wurden.

2.5 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Statistik wurde mit den Tests ANOVA und anschließendem Tukey-Test t durch das Softwareprogramm GraphPad Prism, Windows, Version 3.02 (GraphPad Software) durchgeführt. Das Signifikanzniveau $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ zu Kontrolle, #: zur Probe).

3. ERGEBNISSE

3.1 Wirkung von ML-7 auf EAE

3.1.1 Klinischer EAE Verlauf bei Gabe von ML-7

EAE wurde mit MOG₃₅₋₅₅ in C57/BL6 Weibchen induziert. Die Hälfte der Tiere erhielt zwischen Tag 3 und Tag 12 alle 12 h 2 mg/kg ML-7 intraperitoneal gespritzt. ML-7 ist ein spezifischer Inhibitor der Myosinleichtketten Kinase (MLCK). Die Kontroll-EAE-Tiere entwickelten erste klinische Symptome ab Tag 10 mit dem Höhepunkt der Krankheit um Tag 20. Die mit ML-7 gespritzten Tiere zeigten einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie die Kontrollen, allerdings in abgemilderter Form und mit einer leichten zeitlichen Verzögerung am Beginn der Ausprägung klinischer Symptome (Abb.17). Signifikante Unterschiede im klinischen Score zeigten sich am Tag 11, 12, 14 und 16 sowie in den Tagen 21 und 22.

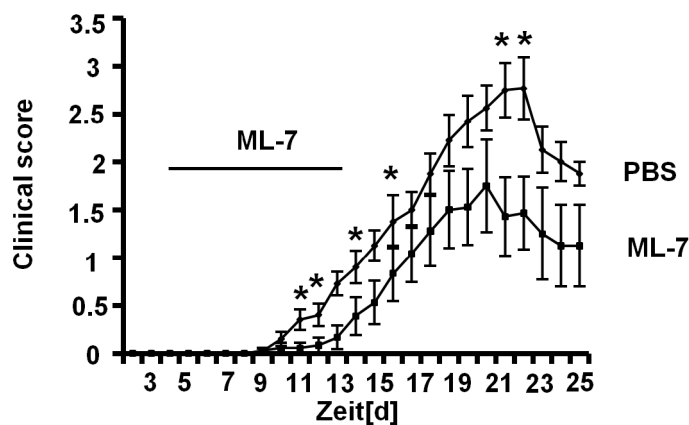


Abb.17: Klinischer EAE Verlauf bei Tieren mit Gabe von ML-7 (zwischen Tag 3 und Tag12) und Kontrolltieren (PBS): ML-7 führt zu einem milderem Krankheitsverlauf.

Dies wirft die Frage nach dem Mechanismus der Protektion auf. In Zellkultur konnte zuvor gezeigt werden, dass die Blockierung der MLCK zu einer verminderten Öffnung der BHS, die durch IL-17A vermittelt wurde, führt. 100 ng/ml IL-17A führt zum Verlust der Integrität des Endothelzelllayers. Dies kann einerseits durch den Radikalfänger NAC (N-acetyl-cystein), andererseits durch die Blockierung des endothelialen kontraktiven Apparats durch die Gabe von ML-7 verhindert werden (Huppert et al., 2009).

So sollte gezeigt werden, ob dieser Mechanismus auch *in vivo* existiert. Dafür bietet sich das EAE Modell an, da gezeigt wurde, dass Th17 Zellen und IL-17A eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielen und dass die Rezeptoren für IL-17A und IL-22 auf Endothelzellen

exprimiert werden (Kebir et al., 2007). Diese Rezeptorexpression wurde allerdings in humanen Zellen gezeigt. Für die hier vorgelegte Arbeit wurden ausschließlich Mauszellen und Mausmodelle verwendet. Ich konnte durch RT-PCR zeigen, dass der IL-17 RA Rezeptor auf Mausendothelzellen vorhanden ist (Abb.18A). Der IL-22 Rezeptor hingegen ist nicht nachweisbar. Deshalb wählte ich die sensitivere Methode der Realtime PCR. Doch auch hiermit ist es nicht möglich den IL-22 Rezeptor nachzuweisen (Abb.18B). Somit wurden die Experimente auf die IL-17A Gabe beschränkt.

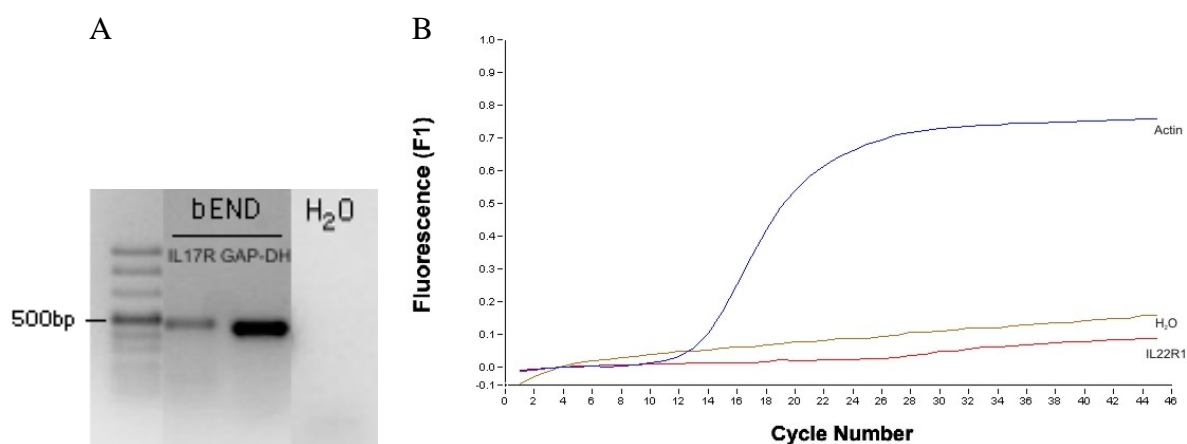


Abb.18: Der IL-17RA Rezeptor ist auf Mausendothelzellen vorhanden (A). Der IL-22 Rezeptor hingegen nicht (B).

3.1.2 Permeabilisierung der BHS

Um den Zusammenbruch der BHS nach EAE Induktion zu zeigen, kann man den Marker Evans Blau verwenden. Bei intakter BHS tritt er nicht ins ZNS Parenchym ein. Die Menge des extravasierten Evans Blue im ZNS wurde photometrisch bestimmt.

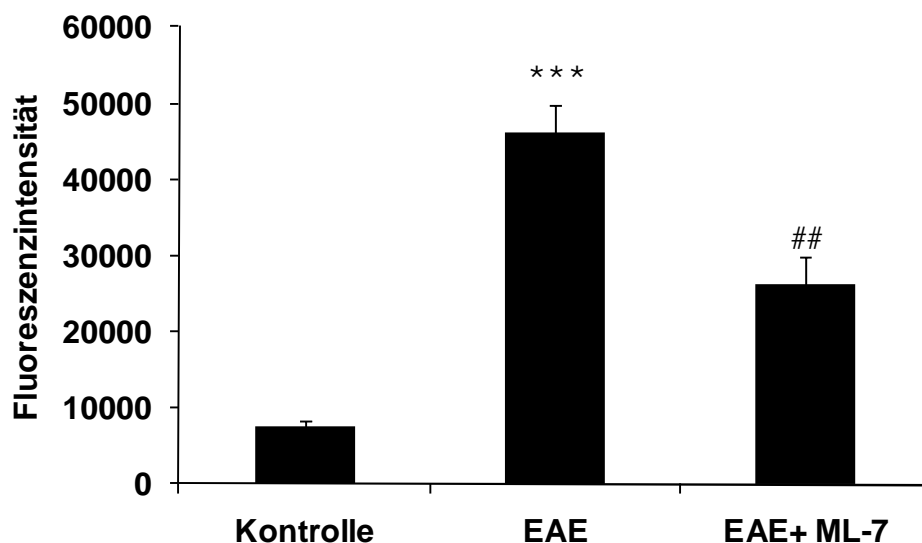
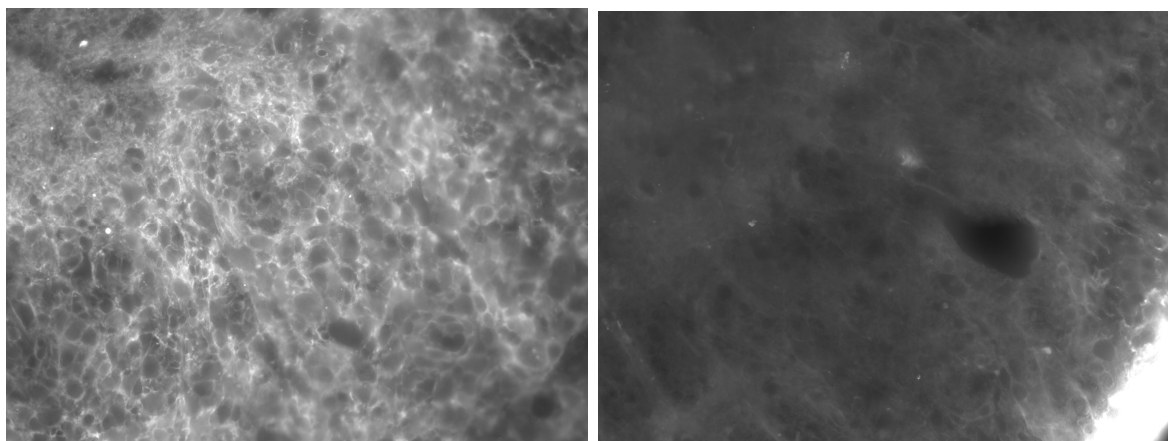


Abb.19: Evans Blue Extravasation: Durch EAE kommt es zu einer vermehrten Extravasation von Evans Blue, das einen Zusammenbruch der BHS anzeigt. Die Gabe von ML-7 kann dies signifikant verringern.

Es konnte gezeigt werden, dass EAE Tiere eine starke Extravasation von Evans Blue haben (Abb.19). Dies zeigt einen Zusammenbruch der BHS. Die Gabe von ML-7 reduziert den Eintritt von Evans Blau in das ZNS Parenchym signifikant, was auf eine geringere Barriestörung schließen lässt.

Um die Daten zu erhärten, wurde als zweiter Marker IgG verwendet (Abb.20). IgG als Bestandteil des Serums ist bei intakter BHS nur in den Gefäßen zu finden. So deutet IgG im ZNS Parenchym auf einen Zusammenbruch der BHS hin.

A



EAE

EAE+ML-7

B

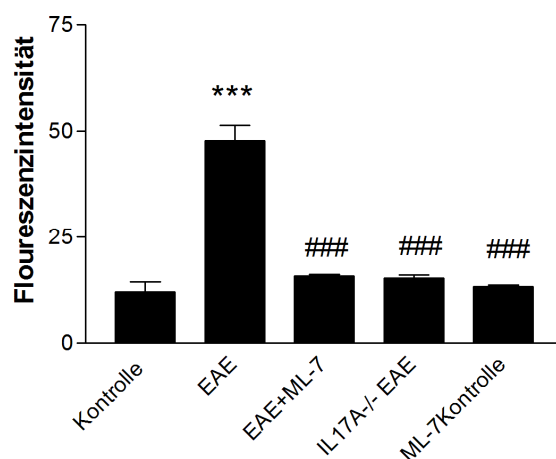


Abb.20: IgG Extravasation: Durch EAE kommt es zu einer verstärkten Extravasation von IgG aus dem Blut, das einen Zusammenbruch der BHS anzeigt. Die Gabe von ML-7 kann dies signifikant verringern. Außerdem zeigen IL-17A^{-/-} Knock-out Mäuse mit EAE einen stark verringerten Zusammenbruch der BHS.

A: repräsentative Aufnahmen der immunhistologischen Färbung am Rückenmark von EAE Tieren und welchen mit ML-7 Gabe.

B: Quantitative Auswertung am Konfokalmikroskop.

Auch mit dem Nachweis von IgG konnte gezeigt werden, dass es bei EAE zu einem Zusammenbruch der BHS kommt und dieser durch die Gabe von ML-7 verhindert werden kann. ML-7 in unimmunisierten Kontrolltieren führt zu keiner Änderung der IgG Extravasation. Außerdem wurden IL-17A^{-/-} Knock-out Tiere verwendet, um den Zusammenhang zwischen IL-17A, EAE und BHS-Versagen zu zeigen. In diesen Tieren kommt es zu keiner vermehrten Extravasation von IgG nach EAE Induktion. Die Fotos zeigen repräsentative Aufnahmen von EAE Tieren und welchen, die zusätzlich mit ML-7 behandelt wurden. Es ist zu beachten, dass beide Aufnahmen mit derselben Belichtungszeit aufgenommen worden sind.

3.1.3 Detektion von pMLC

Nun sollte direkt die Menge an phosphorylierter leichter Kette des Myosins in Endothelzellen gemessen werden, welches durch MLC-Kinase phosphoryliert wird.

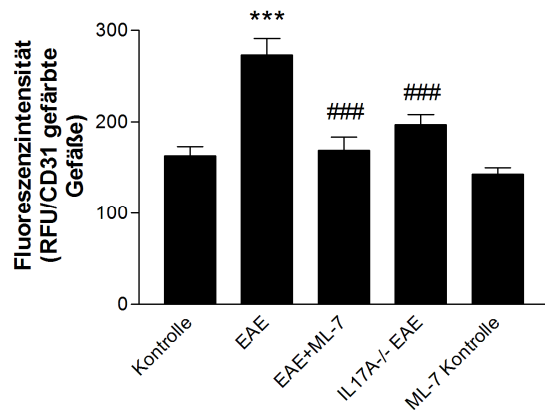


Abb.21: Menge an pMLC: Durch EAE kommt es zu einem signifikanten Anstieg von pMLC. Diese Phosphorylierung kann durch ML-7 Gabe inhibiert werden. Auch in IL-17A^{-/-} Tieren kommt es zu einer geringeren Phosphorylierung unter EAE Bedingungen im Vergleich zu Wildtyp EAE Tieren.

In den EAE Tieren ist pMLC in Endothelzellen signifikant erhöht (Abb.21). Diese Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins lässt sich durch die intraperitoneale Gabe des MLC-Kinase Inhibitors ML-7 komplett blockieren. Auch in IL-17A^{-/-} EAE Tieren ist pMLC signifikant erniedrigt im Vergleich zu Wildtyp EAE Tieren. Somit konnte auch hier der Zusammenhang zwischen IL-17A und einem BHS-Versagen hergestellt werden.

3.1.4 Infiltration von Immunzellen

In vitro konnte gezeigt werden, dass IL-17A die Adhäsion und Transmigration von Monozyten fördert und dass dies durch die Gabe von ML-7 reduziert werden kann (Huppert et al., 2009).

Es ist bekannt, dass bei EAE Immunzellen aus dem Blutstrom in das ZNS einwandern. Nun sollte gezeigt werden, dass ML-7 durch die Inhibierung der Phosphorylierung von MLC und somit des kontraktilen Apparats der BHS-Endothelzellen die Einwanderung der Immunzellen verhindern kann. Dafür wurden Immunzellen aus dem ZNS von EAE Tieren und EAE Tieren mit ML-7 Injektion am Höhepunkt der Krankheit isoliert und im FACS analysiert.

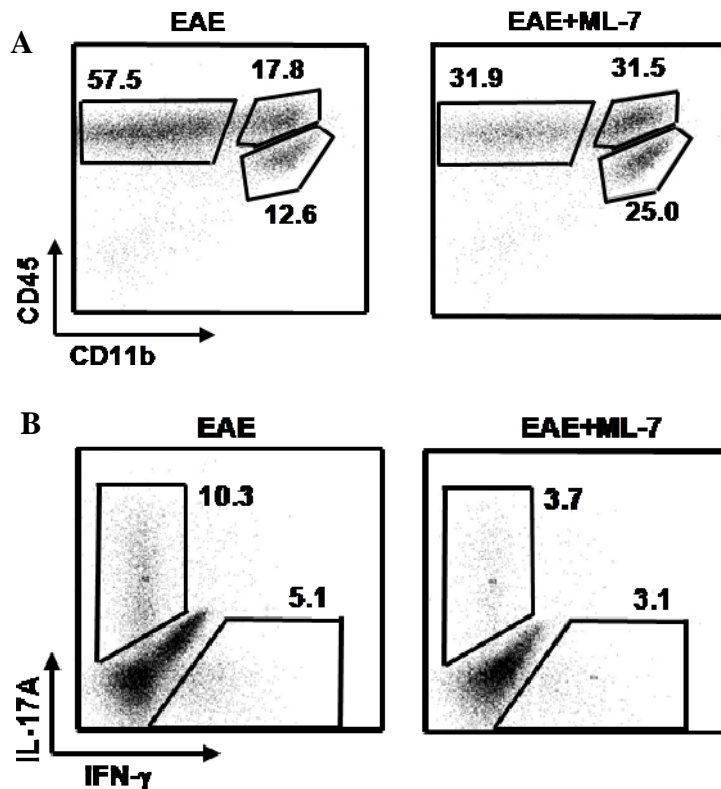


Abb.22: ML-7 hemmt die Infiltration von Lymphozyten (A). Das Verhältnis von Th1 zu Th17 Zellen bleibt annähernd konstant, beide nehmen durch ML-7 Gabe ab (B).

Durch ML-7 Gabe kommt es zu einer Reduktion der Infiltration von CD45.2⁺CD11b⁻ Lymphozyten (Abb.22A). Dies läßt sich auf die verminderte Permeabilität der BHS durch ML-7 zurückführen. Anschließend wurde das Verhältnis der unterschiedlichen T-Zellpopulationen untersucht. Es kommt zu keiner großen Verschiebung des Verhältnisses zwischen Th1 und Th17 Zellen (Abb.22B). Hingegen nimmt die Anzahl der infiltrierten T-Zellen durch ML-7 Gabe in beiden Populationen ab.

3.1.5 Reduzierte mRNA Expression von Th17 Zytokinen

Bei EAE kommt es im Zuge der Entzündungsreaktion im ZNS zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Besonderes Augenmerk wird auf die Zytokine der Th17 Zellen gelegt. Diese Zellen scheinen eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese von EAE und MS zu spielen. Deshalb untersuchte ich, ob diese Zytokine in EAE hochreguliert sind und sich durch die Gabe von ML-7 hemmen lassen. Das Rückenmark dieser Tiere wurde an Tag 20, dem Höhepunkt der klinischen Symptome entnommen und die mRNA extrahiert.

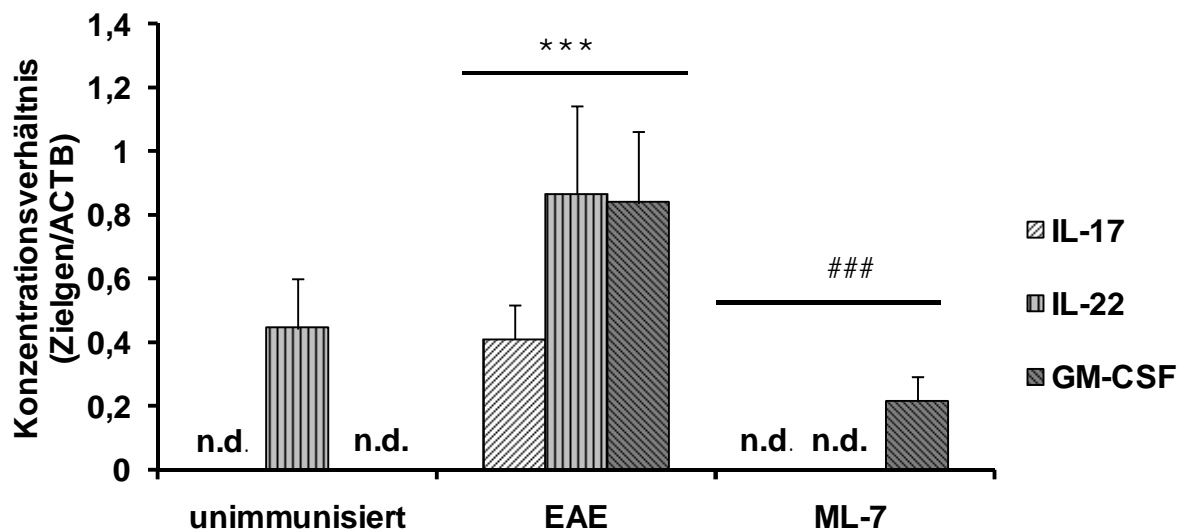


Abb.23: mRNA Expressionslevel der Th17 Zytokine: IL-17A, IL-22 und GM-CSF sind unter EAE Bedingungen deutlich erhöht und lassen sich alle drei durch ML-7 Gabe hemmen.

IL-17A, IL-22 und GM-CSF sind in EAE deutlich erhöht (Abb.23). Diese vermehrte Genexpression läßt sich durch die Behandlung mit ML-7 hemmen. Allerdings wird es sich hier um einen sekundären Effekt handeln: es kommt zu einer verminderten Störung der BHS-Integrität, somit infiltrieren weniger T-Zellen das ZNS und folglich entsteht eine verminderte Entzündungsreaktion. So kommt es auch zur reduzierten Expression von Zytokinen. Da IL-17A und GM-CSF in unimmunisierten Kontrollmäusen nicht detektierbar waren, konnte ich nicht die übliche $\Delta\Delta C_p$ Methode zur Auswertung verwenden. Deshalb musste hier das Konzentrationsverhältnis jedes Gens zu Aktin in jeder der drei untersuchten Konditionen berechnet werden.

3.1.6 Expressionsmuster weiterer EAE relevanter Gene

Außer den oben genannten Th17 Zytokinen habe ich weitere Gene, die in der EAE Pathogenese gegebenenfalls eine Rolle spielen könnten auf ihre Regulation auf mRNA Ebene untersucht: $IFN\gamma$, IL-1 β , TNF α , MCP-1 (monocyte attractant protein), COX1 (Cyclooxygenase), iNOS (induzierte NO Synthase), sowie die Matrixmetalloproteinasen MMP 2, 9, 8, 10 und 12. Bei $IFN\gamma$, MCP-1, COX und MMP2, 9 und 10 konnte ich im Rückenmark von EAE Tieren, die alle einen klinischen Score von 3-4 hatten, keine Hochregulierung feststellen. Die verblieben 5 Gene wurden in EAE hochreguliert und ich untersuchte, ob es durch ML-7 Gabe zu einer verminderten Hochregulierung kommt.

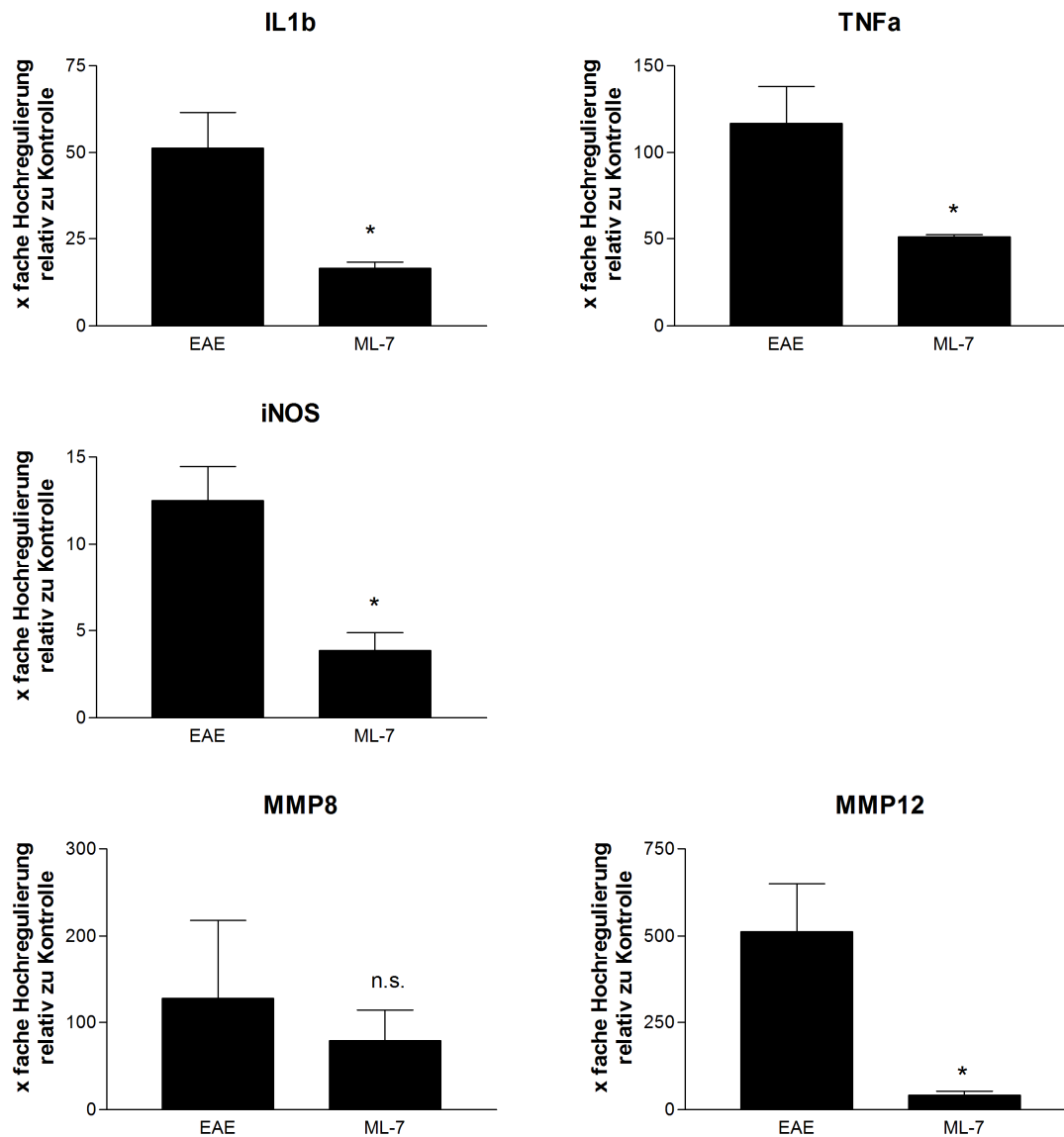


Abb.24: Genexpressionsmuster von EAE Tieren und solchen mit ML-7 Gabe: IL1 β , TNF α , iNOS, MMP8 und MMP12 sind in EAE stark hochreguliert. Alle bis auf MMP8 lassen sich durch die Behandlung der Tiere mit ML-7 hemmen.

IL-1 β , TNF α , iNOS sowie die Matrixmetalloproteinasen MMP8 und 12 zeigen eine klare Hochregulation in EAE (Abb.24). Mit Ausnahme von MMP8 lässt sich die Genregulation durch ML-7 Gabe reduzieren.

3.1.7 ROS Detektion in EAE Tieren

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen in der EAE Pathogenese eine wichtige Rolle. Sie können Signalwege anstoßen oder auch direkt toxisch auf Neurone und Oligodendrozyten wirken.

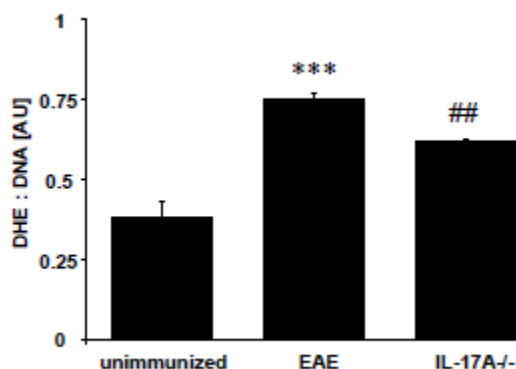


Abb.25: ROS Produktion im Rückenmark von EAE Tieren: Durch EAE kommt es zu einer vermehrten ROS Produktion. IL-17A^{-/-} Kock-out Tiere zeigen einen geringeren Anstieg von ROS unter EAE im Vergleich zu Wildtyptieren.

Ich konnte mit Hilfe des ROS sensitiven Farbstoffs DHE zeigen, dass die ROS Produktion im Rückenmark von EAE Tieren signifikant erhöht ist im Vergleich zu unimmunisierten Kontrolltieren. Der Zusammenhang mit IL-17A konnte durch die Verwendung von IL-17A^{-/-} Knockout Tieren gezeigt werden. Diese zeigten eine deutlich verringerte ROS Bildung im Rückenmark im Vergleich zu Wildtyptieren.

Nun sollte die ROS Produktion näher lokalisiert werden. In Kofärbungen für Superoxid (DHE) und Endothelzellen (FITC-LEA) konnte mit FACS Analysen die ROS-Produktion speziell in Endothelzellen bestimmt werden.

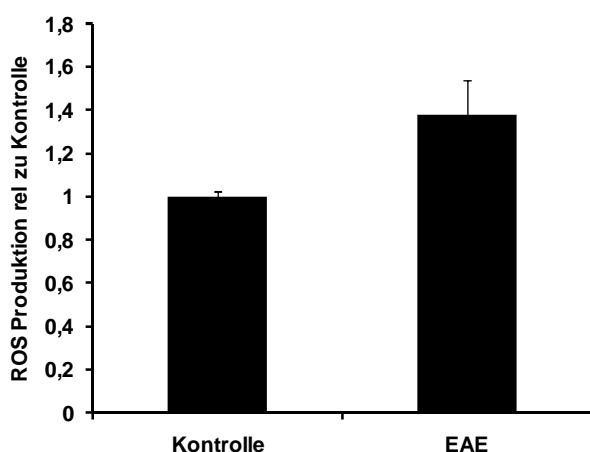


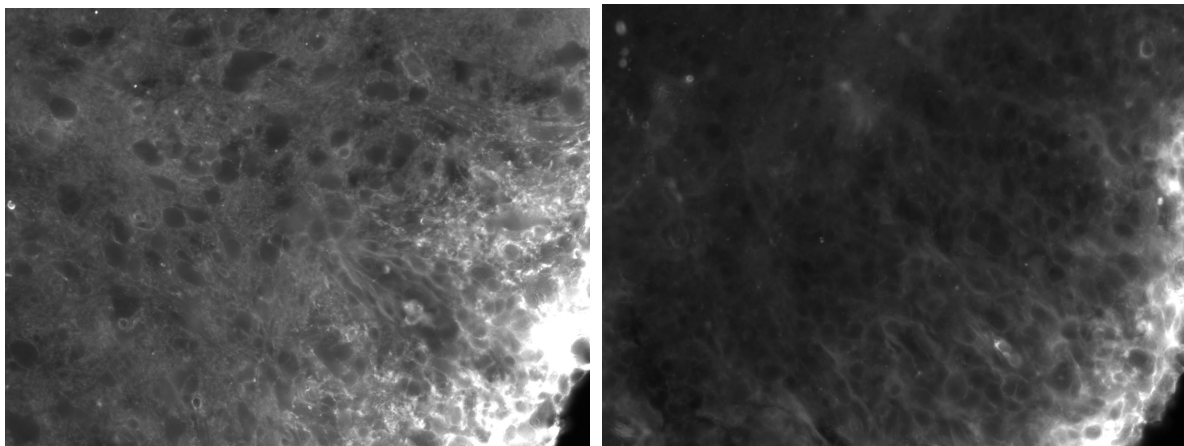
Abb.26: ROS Produktion in Endothelzellen: In EAE bilden Endothelzellen des Rückenmarks vermehrt ROS.

Es zeigte sich, dass die ROS Produktion in Endothelzellen des Rückenmarks von immunisierten Tieren unter EAE Bedingungen erhöht ist (Abb.26). Dies ergänzt die Aussage,

dass ROS im Gesamthomogenat des Rückenmarks erhöht ist. Durch FACS Analyse konnte ich nun spezifisch die erhöhte ROS Produktion in Endothelzellen nachweisen. Außer in Endothelzellen wird ROS auch in Mikroglia ROS gebildet.

3.1.8 Aktivierte Mikroglia in EAE Tieren

Mikroglia sind die ständigen Immunzellen im ZNS. Sie werden schnell aktiviert, wenn Schädigungen auftreten. Bei EAE kommt es zur Aktivierung von Mikroglia. ICAM ist ein Marker für aktivierte Mikroglia (Dissing-Olesen et al., 2007).



EAE

ML-7 EAE

Abb.27: Immunhistologische ICAM Färbungen von Mikroglia im Rückenmark von Tieren mit EAE und mit zusätzlicher ML-7 Gabe: Die Gabe von ML-7 reduziert die Aktivierung von Mikroglia unter EAE Bedingungen.

Diese Aufnahmen zeigen, dass die klar vorhandene Mikroglia population in EAE Tieren durch Behandlung der Tiere mit ML-7 stark reduziert wird (Abb.27). Auch hier ist wieder zu beachten, dass beide Aufnahmen mit derselben Belichtungszeit aufgenommen wurden.

3.2 Effekte von IL-17A auf Mikroglia

Im Folgenden wird nun genauer auf die Effekte von IL-17A auf Mikroglia eingegangen. Im ersten Schritt erfolgte die Analyse an organotypischen Kortex-Schnitten. Um das System weiter zu vereinfachen, wurde anschließend mit der Mikroglia-Zelllinie BV-2 gearbeitet.

3.2.1 Th17 Zytokine aktivieren Mikroglia

Die Zytokine, die hauptsächlich von Th17 Zellen ausgeschüttet werden, wurden auf die Aktivierungsfähigkeit von Mikroglia getestet. Alle Zytokine wurden in einer Konzentration von 100 ng/ml für 24h auf die organotypischen Schnitte gegeben. CD68 ist ein Oberflächenantigen, das spezifisch auf aktivierten Mikroglia exprimiert wird.

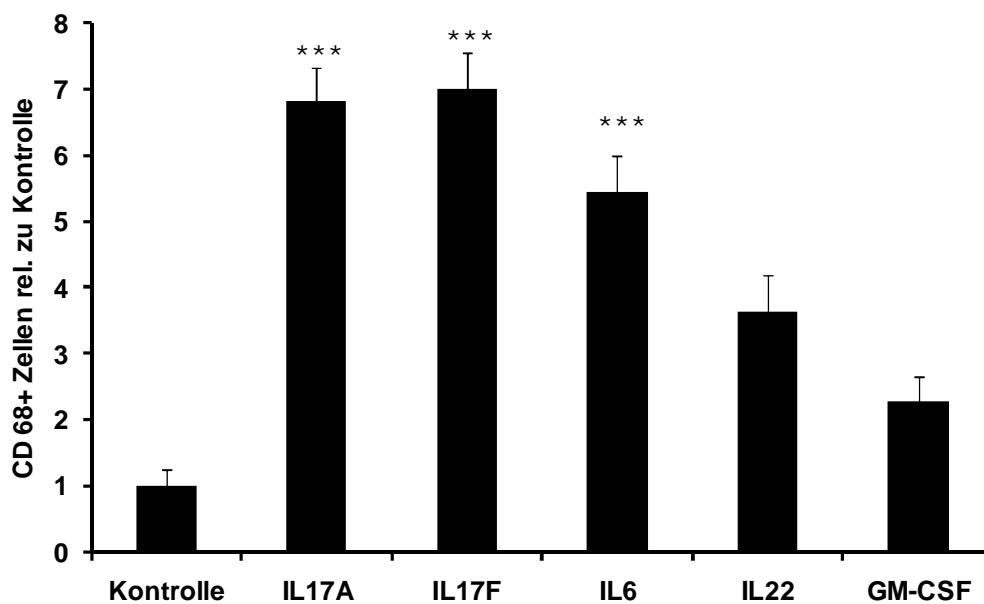


Abb.28: Aktivierte Mikroglia nach Stimulation mit Th17 Zytokinen in organotypischen Kortexkulturen: IL-17A und F, sowie IL-6 führen zu einer signifikanten Aktivierung von Mikroglia.

Es zeigte sich, dass IL-17A und F, sowie IL-6 Mikroglia aktivieren (Abb.28). IL-22 und GM-CSF zeigen keinen signifikanten Anstieg der CD68⁺ Zellen. Im Folgenden konzentrierte ich mich auf die Effekte von IL-17A auf Mikroglia.

3.2.2 Spezifische Mikrogliaaktivierung durch 100 ng/ml IL-17A

Es stellt sich die Frage, ab welcher Konzentration IL-17A zu einer Aktivierung von Mikroglia führt. So gab ich 1, 10 und 100 ng/ml IL-17A für 24 h auf die organotypischen Kortexkulturen.

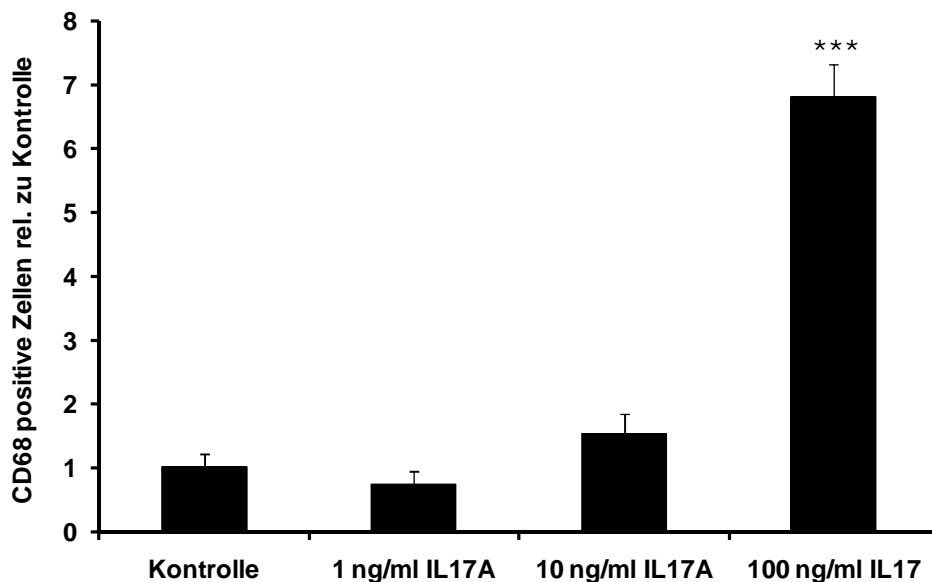


Abb.29: Konzentrationsabhängigkeit der IL-17A vermittelten Mikrogliaaktivierung. 100ng/ml IL-17A führen zu einer signifikanten Aktivierung von Mikroglia.

Bei 1 ng/ml und 10 ng/ml IL-17A kommt es zu keinem signifikanten Anstieg der Anzahl aktivierter Mikroglia im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Erst 100 ng/ml IL-17A aktivieren Mikroglia (Abb.29).

Um zu überprüfen, ob der Effekt der Aktivierung spezifisch für IL-17A ist oder ob dies auf Verunreinigungen der Substanz durch z.B. LPS-Reste zurückzuführen ist, gab ich einen neutralisierenden anti-IL-17A Antikörper zu.

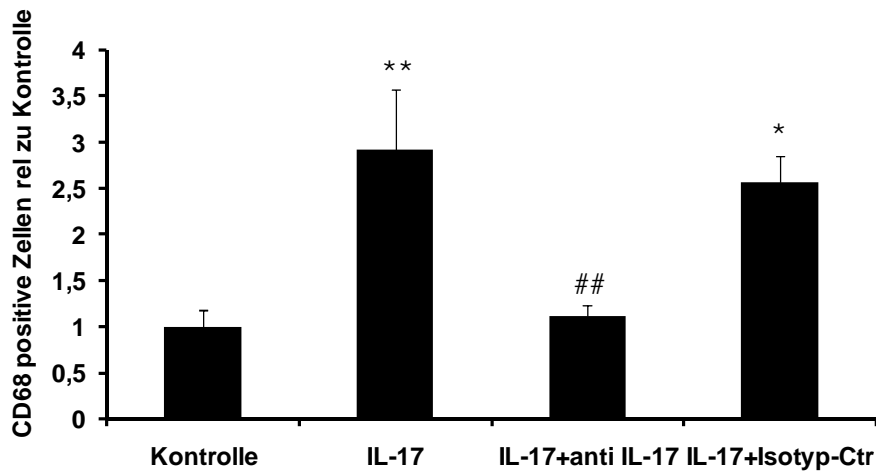
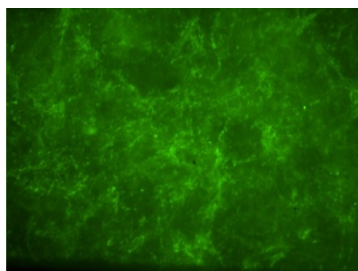
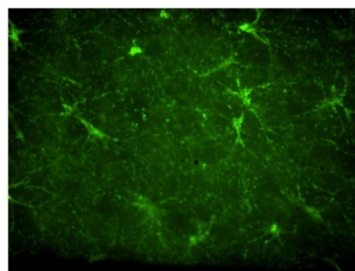


Abb.30: IL-17A vermittelte Mikrogliaaktivierung lässt sich durch anti-IL-17A Antikörper hemmen, womit gezeigt ist, dass es sich hierbei um eine spezifische Aktivierung handelt.

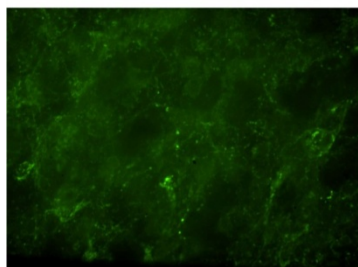
Durch einen anti-IL-17A Antikörper lässt sich der Aktivierungseffekt komplett verhindern (Abb.30). Ein Isotyp-Kontrollantikörper zeigt keine Wirkung. Somit wurde gezeigt, dass die Reaktion spezifisch für IL-17A ist.



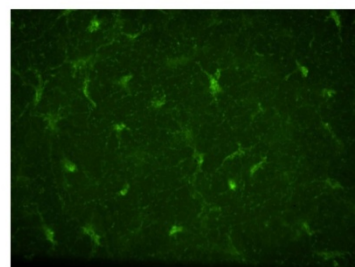
Kontrolle



100ng/ml IL-17



IL-17+ α -IL-17



IL-17+Isotyp-Kontrolle

Abb.31: CD68 immunhistologische Färbung: 100 ng/ml IL-17A führen zu einer Aktivierung von Mikroglia. Das lässt sich durch anti-IL-17A Antikörper verhindern.

Abb.31 zeigt repräsentative Bilder der CD68 Färbung, bei denen man nochmals gut sieht, dass IL-17A Mikroglia aktiviert und dies durch den anti-IL-17A Antikörper verhindert wird.

Da nun gezeigt wurde, dass IL-17A einen Effekt auf Mikroglia hat, verwendete ich für die weitere Analyse der Effekte die murine Mikroglia-Zelllinie BV-2.

3.2.3 BV-2 Zellen exprimieren den IL-17RA Rezeptor

Um den Effekt von IL-17A auf Mikroglia an der murinen Zelllinie BV-2 analysieren zu können, musste zuerst nachgewiesen werden, dass diese den Rezeptor für IL-17A exprimiert. Hierfür isolierte ich RNA aus den Zellen und führte eine RT-PCR durch.

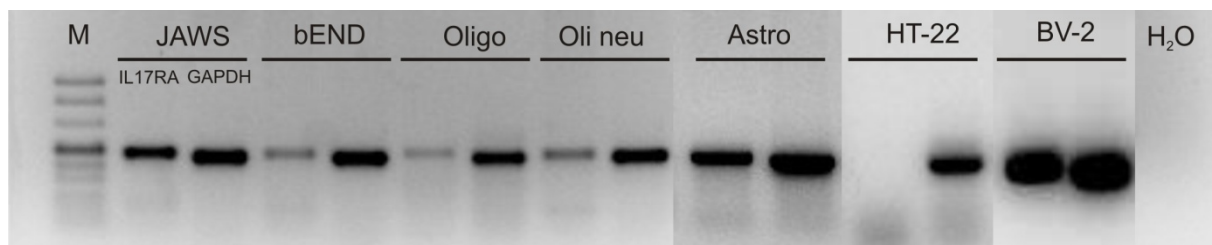


Abb.32: Expression des IL-17RA Rezeptors auf verschiedenen Zellarten und -linien. BV-2 Zellen exprimieren den Rezeptor (M: Marker, JAWS: Monozytenzelllinie, bEND: Endothelzelllinie, Oligo: primäre Oligodendrozyten, Oli neu: Oligodendrozytenzelllinie, Astro: primäre Astrozyten, HT-22: neuronale Zelllinie, BV-2 Mikroglia-Zelllinie).

Der murine IL-17RA Rezeptor ist auf Gliazellen exprimiert (Abb.32): Sowohl auf primären Astrozyten und Oligodendrozyten, wie auch auf den Zelllinien Olineu (Oligodendrozyten) und BV-2 (Mikroglia). Die PCR für den IL-17RA Rezeptor ist in jeder ersten Spur aufgetragen, als Kontrolle ist in jeder zweiten Spur GAPDH aufgetragen.

Somit sollte die mikrogliale Zelllinie BV-2 auf IL-17A Stimulation reagieren.

3.2.4 Einfluss von IL-17A auf die ROS Produktion

Aktivierte Mikroglia bilden große Mengen an ROS sowohl für die unspezifische Immunantwort als auch zur Signaltransduktion. Zuerst bestimmte ich den optimalen Zeitpunkt und die optimale Konzentration des IL-17A um eine ROS Produktion *in vitro* messen zu können. Die ROS Produktion wurde mit dem Farbstoff DCFH gemessen, der in Anwesenheit von ROS zum fluoreszierenden Stoff DCF oxidiert wird.

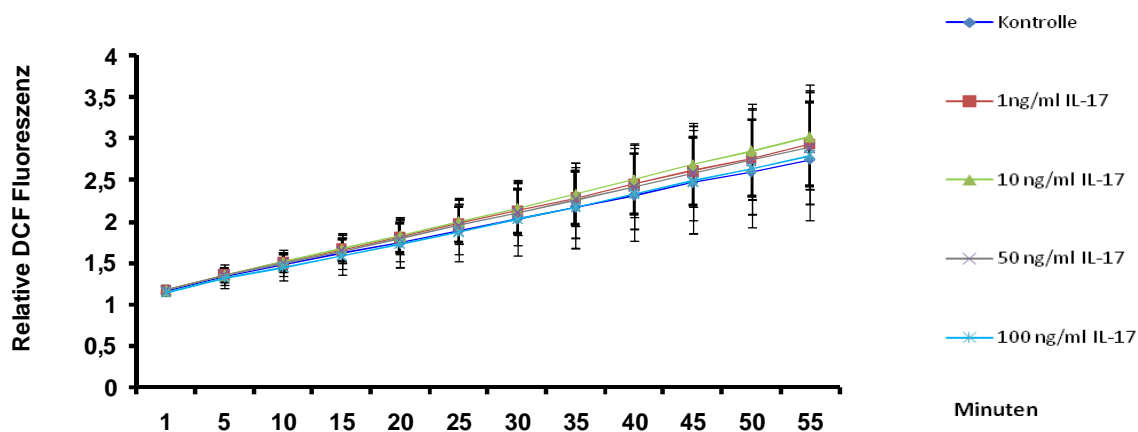


Abb.33: ROS Produktion während 1h nach IL-17A Stimulation. Es zeigt sich kein Effekt.

Misst man kontinuierlich die ROS Produktion der BV-2 Zellen während einer Stunde, gibt es keinen Unterschied bei 1, 10, 50 und 100 ng/ml IL-17A im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb.33).

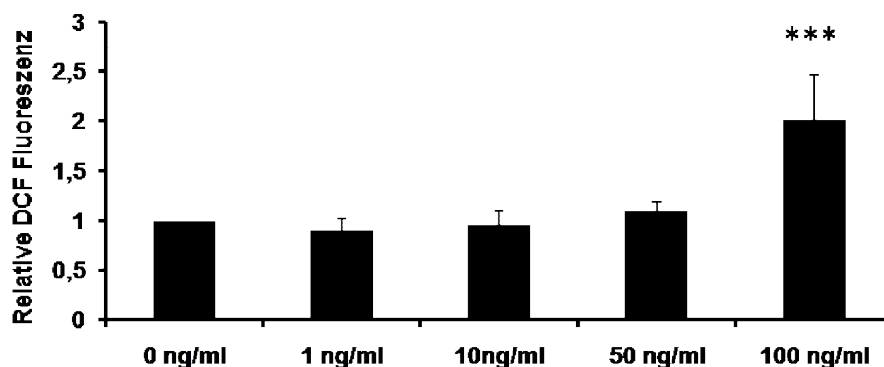


Abb.34: ROS Produktion nach 24h: 100 ng/ml IL-17A führen zu einer verstärkten ROS Produktion in BV-2 Zellen.

Stimuliert man hingegen die Zellen für 24h mit 1, 10, 50 und 100 ng/ml IL-17A und misst anschließend die ROS Produktion, so sieht man eine signifikant erhöhte ROS Produktion bei einer Stimulation mit 100 ng/ml IL-17A im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb.34).

3.2.5 Quellen der ROS Produktion

Nun sollte bestimmt werden, welche Art von reaktiver Sauerstoffspezies nach IL-17A Stimulation entsteht. Hierfür gab ich einerseits Superoxiddismutase (SOD) zu, die Superoxid zu Wasserstoffperoxid umwandelt. Andererseits wurde Katalase eingesetzt, welche Wasserstoffperoxid in Wasser und molekularen Sauerstoff spaltet.

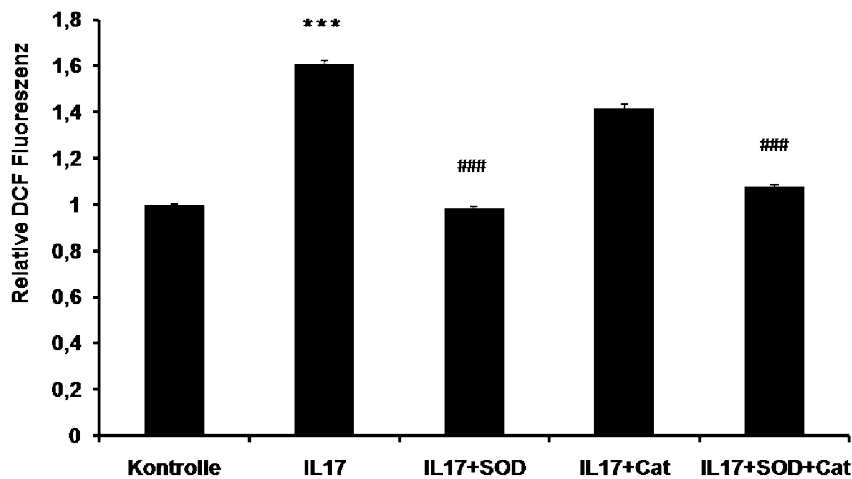


Abb.35: Quellen der ROS Produktion: SOD verhindert die IL-17A vermittelte ROS Produktion. Dies zeigt, dass Superoxid produziert wird.

Ich konnte zeigen, dass BV-2 Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-17A für 24h vermehrt ROS bilden und dass diese Produktion durch Zugabe von SOD verhindert werden kann (Abb.35). Katalase hingegen hat keinen Einfluss auf die ROS Produktion nach IL-17 Stimulation. Dies zeigt an, dass es nach IL-17A Stimulation zur Produktion von Superoxid kommt. Auch die Kombination von SOD und Katalase hat keinen zusätzlichen Effekt auf die ROS Bildung im Vergleich zu der Gruppe, in der nur SOD zugegeben wurde.

Nun wollte ich die Quelle der Superoxidproduktion bestimmen. Hauptproduzent für Superoxid ist die NAD(P)H-Oxidase, die als Nebenprodukt große Mengen Superoxid produziert. Apocynin ist ein spezifischer Inhibitor der NAD(P)H-Oxidase.

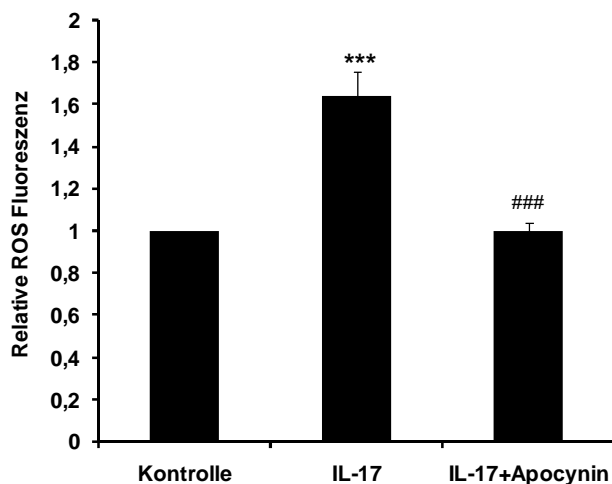


Abb.36: Quelle der Superoxidproduktion: Apocynin hemmt die ROS Produktion. Somit konnte die NAD(P)H Oxidase als Quelle ausgemacht werden.

Durch Zugabe von Apocynin konnte die IL-17A vermittelte Superoxidproduktion gehemmt werden (Abb.36). Somit ist die NAD(P)H Oxidase als Quelle der ROS Produktion nach IL-17A Stimulation identifiziert.

3.2.6 Proliferation nach IL-17A Stimulation

Nachdem Mikroglia aktiviert wurden, kommt es zu einer Proliferation dieser Zellen um eine adäquate Immunantwort auszuführen und die Entzündungsreaktion zu amplifizieren. Mit Alamarblue Assays konnte auf einfach Weise die Zunahme der Zellzahl verfolgt werden. Die Experimente wurden jeweils auf die unstimulierten Kontrollen zum selben Zeitpunkt normiert.

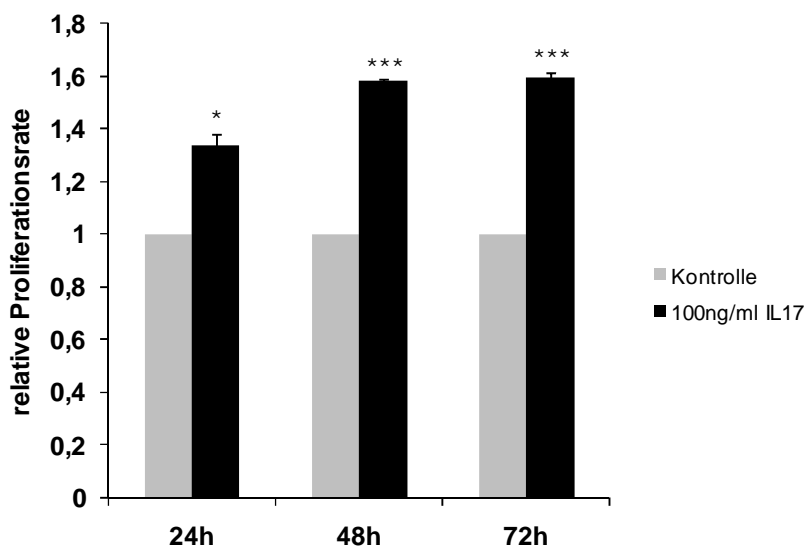


Abb.37: Proliferation nach 100 ng/ml IL-17A Stimulation.

Nach 24h kommt es zu einer vermehrten Proliferationsrate durch IL-17A Stimulation. Diese verstärkt sich nach 48h und zeigt sich auch 72h (Abb.37).

Nun sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der oben gezeigten Superoxidproduktion und der verstärkten Proliferation gezeigt werden. Dafür wurde der NAD(P)H-Inhibitor Apocynin hinzugefügt und die Proliferationsrate nach 48h und 72h gemessen, da dies die optimalen Zeitpunkte nach IL-17A Stimulation darstellte.

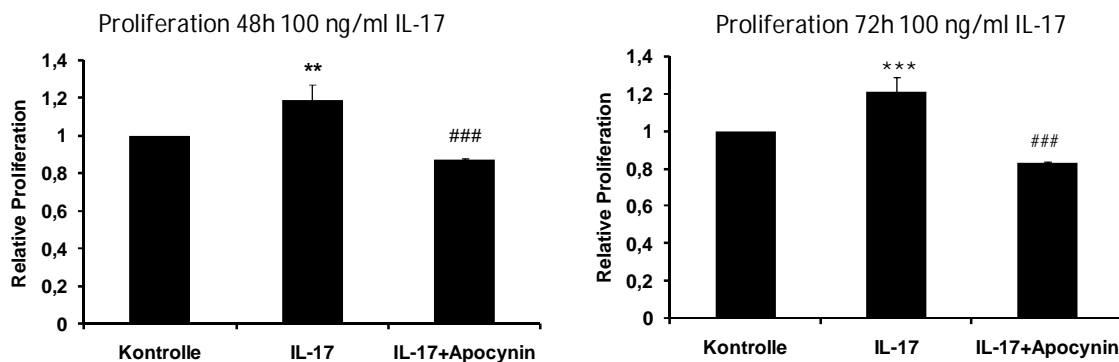


Abb.38: Hemmung der IL-17A vermittelten Proliferation durch Inhibierung der ROS Produktion. Apocynin inhibiert die vermehrte Proliferation. Dieser Effekt konnt sowohl nach 48 h als auch nach 72 h gezeigt werden.

Die IL-17A vermittelte vermehrte Proliferationsrate der BV-2 Zellen ließ sich komplett durch Apocynin hemmen (Abb.38). Dies zeigt, dass die Proliferation von der ROS Produktion abhängig ist.

3.2.7 Vermehrte Migration durch IL-17A Stimulus

Aktivierte Mikroglia müssen an den Ort der Verletzung migrieren. Von dort ausgesendete proinflammatorische Signale führen dazu, dass weitere Mikroglia rekrutiert werden.

Mit Hilfe der „Boyden Chamber“ (chemotaktische Kammer) untersuchte ich, ob IL-17A als Migrationssignal fungieren kann. fMLP wurde als Positivkontrolle eingesetzt (Forstreuter, 2002).

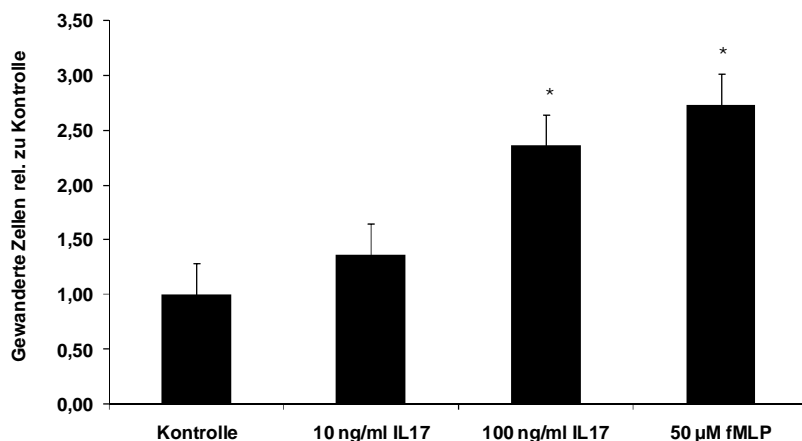


Abb.39: Migration nach IL-17A Stimulation: 100 ng/ml IL-17A führen nach 18h zu einer vermehrten Migration der BV-2 Zellen.

Nach 18h Migrationszeit konnte eine vermehrte Migration der BV-2 Zellen mit IL-17A Stimulus detektiert werden (Abb.39). 10 ng/ml führen zu einem leichten Anstieg, 100 ng/ml zu einer signifikant erhöhten Migrationsrate, die mit der häufig verwendeten Positivkontrolle fMLP in einer Größenordnung liegt.

3.2.8 Inhibierung der IL-17A vermittelten Migration

Nun wollte ich einen mechanistischen Zusammenhang zwischen ROS Produktion und vermehrter Migration herstellen. Deshalb gab ich einerseits SOD ins Medium um das entstandene Superoxid sofort zu spalten, andererseits Apocynin um die Produktion des Superoxids zu verhindern.

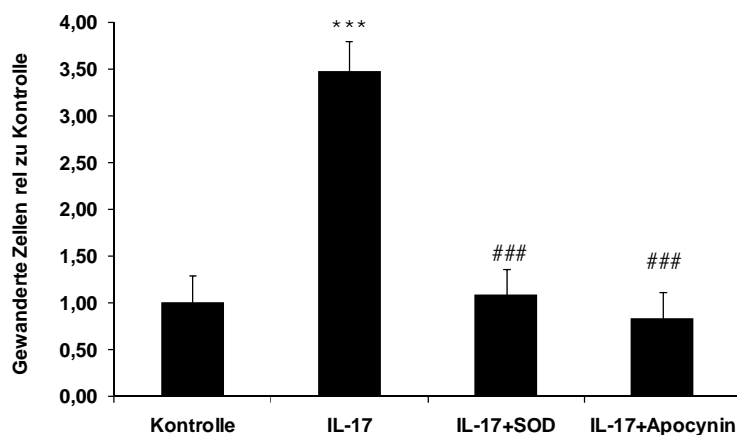


Abb.40: Inhibierung der IL-17A vermittelten Migration durch Hemmung der ROS Produktion: Sowohl SOD als auch Apocynin inhibieren die vermehrte Migration.

Sowohl SOD als auch Apocynin hemmen die IL-17A stimulierte Migration der BV-2 Zellen (Abb.40). Dies zeigt, dass IL-17A zuerst zur ROS Produktion in Mikroglia führt und es anschließend zu einer vermehrten Migration kommt.

Durch Zugabe eines neutralisierenden anti-IL-17A Antikörper wurde bewiesen, dass dieser Mechanismus spezifisch für IL-17A ist.

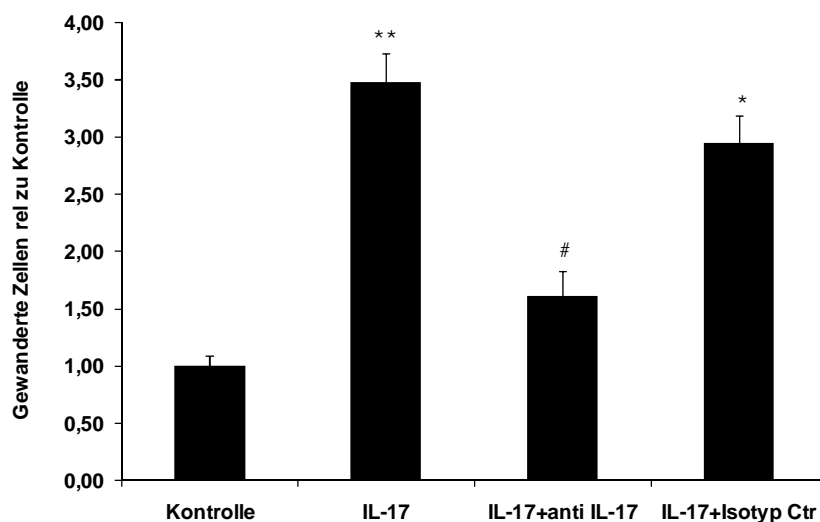


Abb.41: Spezifische Hemmung der IL-17A vermittelten Migration durch anti-IL-17A Antikörper.

Der anti-IL-17A Antikörper verhindert die stärkere Migrationsrate, wohingegen ein Isotyp-Kontrollantikörper keinen Einfluss auf die IL-17A vermittelte Migration hat (Abb.41). Dies zeigt nochmals, dass auch der Effekt auf die Migration spezifisch durch IL-17A hervorgerufen wurde und nicht durch verunreinigende Stoffe aus dem Medium oder der Kammervorrichtung.

3.3 Zusammenhang zwischen intrazellulärem Kalziumgehalt und IL-17A vermittelter Mikrogliaaktivierung

3.3.1 NMDA- Rezeptoruntereinheit NR1 ist auf BV-2 Zellen exprimiert

NMDA-Rezeptoren sind spannungs- und ligandengesteuerte Ca^{2+} -Kanäle. Kalzium ist ein äußerst wichtiger Botenstoff für intrazelluläre Signalwege. Bei der Mikrogliaaktivierung kommt es häufig zu einer intrazellulären Erhöhung der Kalziumkonzentration.

Mit Hilfe der realtime PCR konnte ich nachweisen, dass die in allen funktionsfähigen NMDA- Rezeptoren enthaltene und für die Funktion essentielle Untereinheit NR1 in BV-2 Zellen exprimiert wird (Abb.42).

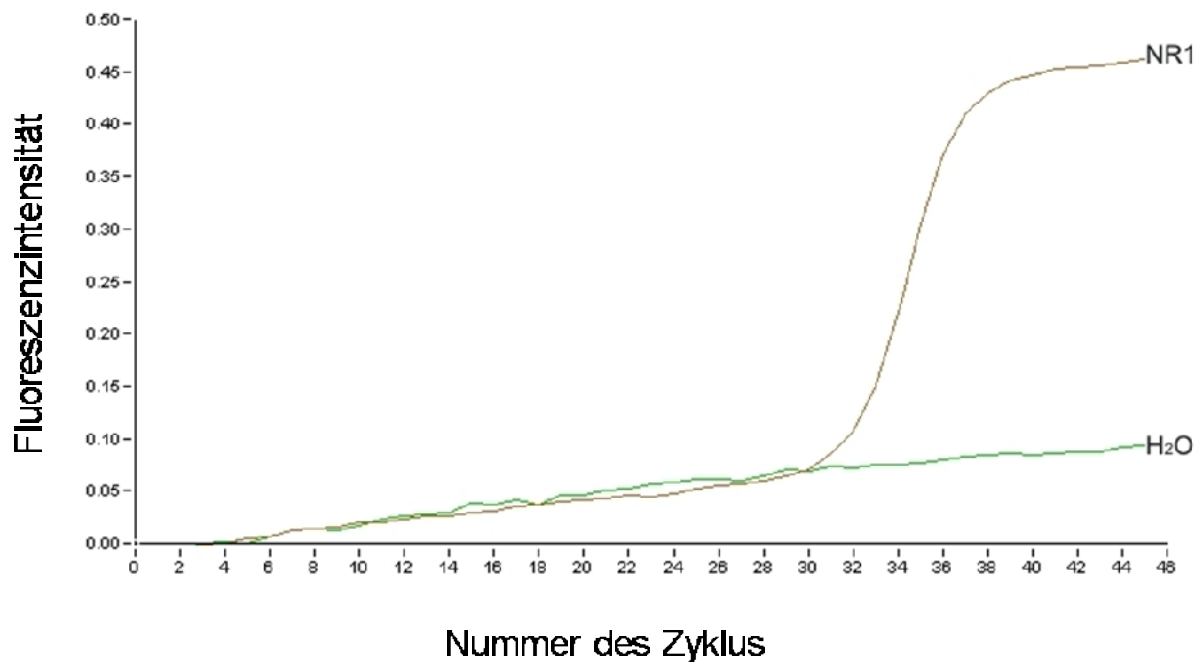


Abb.42: mRNA Expression der NR1 Untereinheit des NMDA Rezeptors auf BV-2 Zellen.

3.3.2 Hemmung der ROS Produktion durch NMDA-Rezeptor Blockierung

Im vorigen Kapitel konnte ich zeigen, dass IL-17A zur ROS Produktion führt und dies zur vermehrten Proliferation und Migration von BV-2 Zellen. Nun wollte ich eine Verbindung zum Kalziumsignalweg ziehen. Wie zuvor wurde die ROS Produktion bei 100 ng/ml IL-17A Stimulation nach 24h mit DCF gemessen. Ich verwendete zwei Inhibitoren des NMDA-Rezeptors: MK 801 ist ein nicht-kompetitiver Rezeptor Blocker, wohingegen AP5 kompetitiv an die Ligandenbindungsstelle bindet.

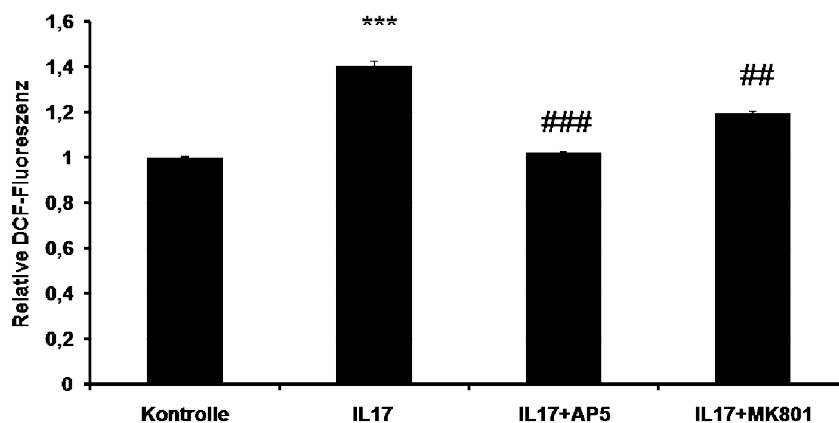


Abb.43: Inhibierung der IL-17A vermittelten ROS Produktion durch NMDA-Rezeptor Blocker: Sowohl MK 801 als auch AP5 hemmen die vermehrte ROS Produktion.

Sowohl mit MK 801 als auch mit AP5 kann die IL-17A vermittelte verstärkte ROS Produktion inhibiert werden (Abb.43). Somit ist ein Zusammenhang zwischen IL-17A und NMDA-Rezeptor hergestellt worden.

3.3.3 Hemmung der IL-17A vermittelten Proliferation durch NMDA-Rezeptor Blockierung

Da sich also zeigte, dass ein Kalziumsignal in die IL-17A vermittelte Mikrogliaaktivierung involviert ist, wollte ich weiter untersuchen, ob sich durch die Hemmung des Kalziumeinstroms die Proliferation der BV-2 Zellen hemmen lässt.

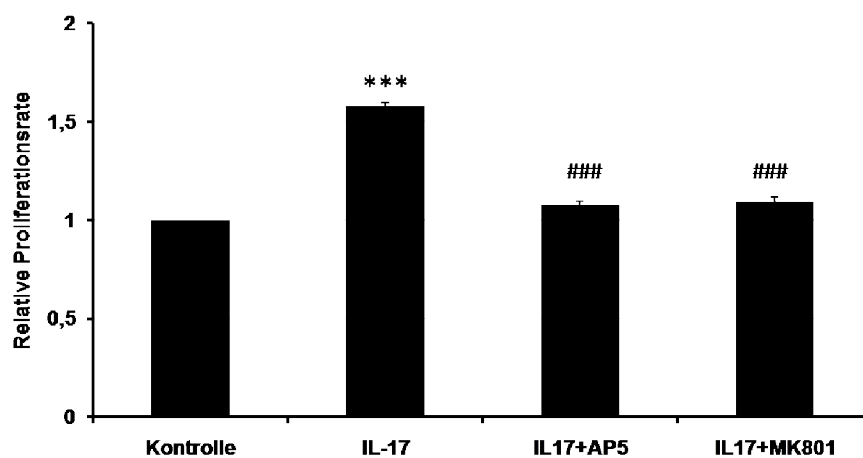


Abb.44: Inhibierung der IL-17A vermittelten Proliferation (nach 48 h) durch NMDA Rezeptor Blocker: Sowohl MK 801 als auch AP5 hemmen die vermehrte Proliferation.

Beide NMDA-Rezeptor Inhibitoren hemmen vollständig die vermehrte Proliferationsrate, die durch IL-17A Stimulation nach 48h zu beobachten ist (Abb.44).

3.3.4 Zytokinfreisetzung nach IL-17A Stimulation

Aktivierte Mikroglia produzieren und sekretieren viele verschiedene Zytokine und Chemokine, um ein pro-inflammatorisches Milieu aufzubauen. So konnte ich im Überstand der BV-2 Zellen nach 24 stündiger Stimulation mit 100 ng/ml IL-17A die Zytokine IL-6 und auch G-CSF detektieren (Abb.45).

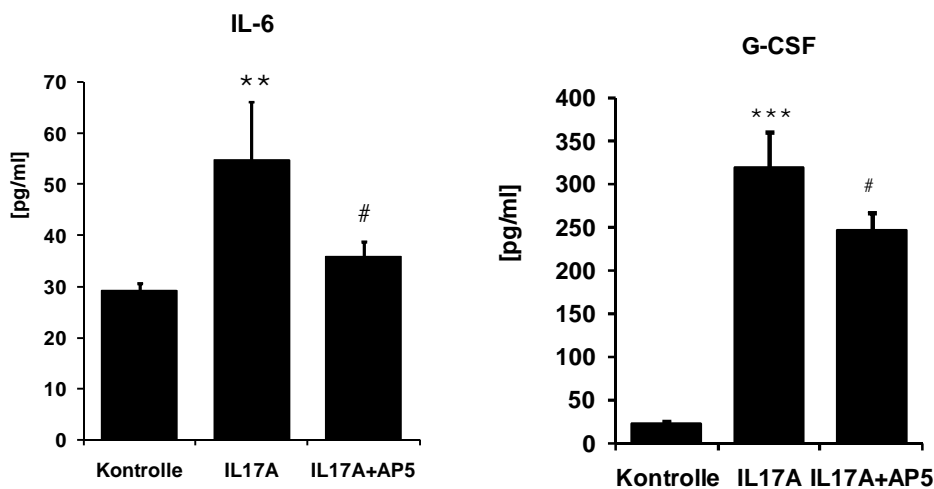


Abb.45: Sekretion von IL-6 und G-CSF nach IL-17A Stimulation. Diese Zytokinfreisetzung läßt sich durch Inhibierung des NMDA-Rezeptors mit AP5 hemmen.

Es kommt bei beiden Zytokinen zu einer Verminderung der Proteinsekretion, wenn der NMDA-Rezeptor Inhibitor AP5 zugegeben wird. Dies deutet darauf hin, dass es durch IL-17A zu einem Ca^{2+} -Einstrom kommt und dass dieses Kalziumsignal für die Zytokinausschüttung benötigt wird.

Zu der vermehrten Freisetzung von IL-6 und G-CSF kann es entweder durch Veränderung der Genexpression, also auf mRNA Ebene kommen, oder aber durch posttranslationale Modifikationen und vermehrte Sekretion von zellulär gespeicherten Proteinen. Ich überprüfte mit Hilfe von realtime PCR, ob es nach IL-17A Stimulierung auch auf mRNA Ebene zu Veränderung der IL-6 und G-CSF Expression kommt.

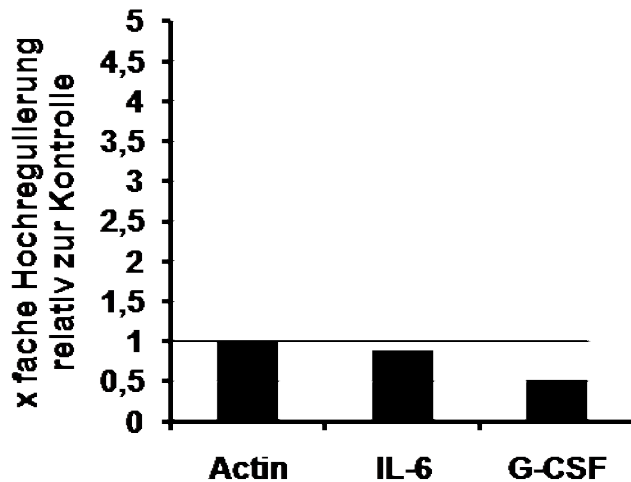


Abb.46: mRNA Expressionsrate nach IL-17A Stimulation: Das mRNA Level ändert sich weder bei IL-6 noch bei G-CSF nach IL-17A Stimulation.

Auf mRNA Ebene wird weder IL-6 noch G-CSF reguliert (Abb.46). Die Expressionsrate nach 24h IL-17A Stimulation bleibt vielmehr konstant. Es kommt nur zu einer vermehrten Proteinfreisetzung oder zu posttranslationalen Modifikationen, die zu mehr verfügbarem Protein führen.

3.3.5 Kalziummessung

In einem nächsten Schritt wollte ich direkt die intrazelluläre Kalziumkonzentration analysieren. Dafür setzte ich den Kalzium-sensitiven Farbstoff Fluo-3 ein. Fluo-3-AM liegt als Ester vor und kann so in die Zelle aufgenommen werden. Dort wird er zu Fluo-3 hydrolysiert, kann an Kalzium binden und so als Fluoreszenzsignal detektiert werden.

Misst man die Ca^{2+} -Freisetzung nach Zugabe von 100 ng/ml IL-17A während 1h, gibt es keinen Unterschied zur unstimulierten Kontrolle (Abb.47).

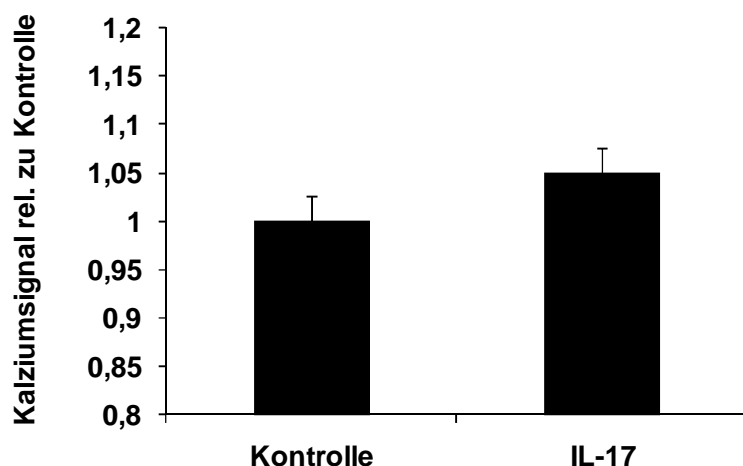


Abb.47: Kalziumsignal nach 1h IL-17A Stimulation: Es zeigt sich kein Unterschied zwischen Kontrolle und IL-17A stimulierten BV-2 Zellen.

Da auch in allen vorhergegangenen Experimenten eine Stimulationszeit von ca. 24h benötigt wurde, stimulierte ich die Zellen zuerst mit 100 ng/ml IL-17A für 24h und habe dann das Kalziumsignal während 30 min gemessen.

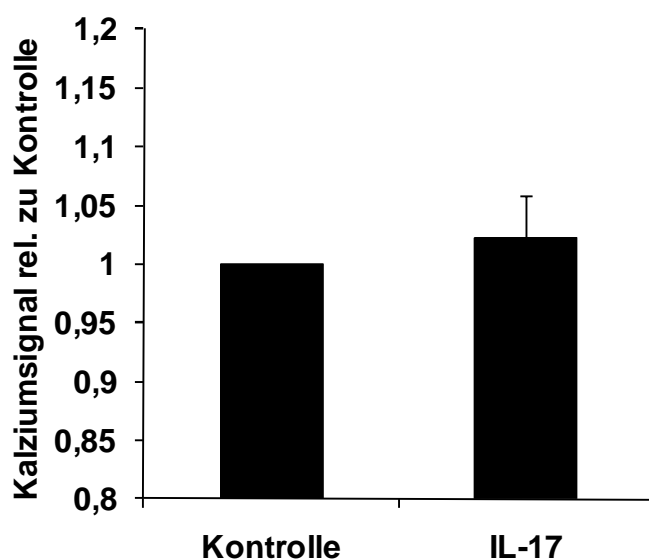


Abb.48: Kalziumsignal nach 24h IL-17A Stimulation: Es zeigt sich kein Unterschied zwischen Kontrolle und IL-17A stimulierten BV-2 Zellen.

Auch nach 24h IL-17A Vorstimulation gibt es keinen Unterschied zwischen IL-17A stimulierten Zellen und unstimulierter Kontrolle (Abb.48).

Daraus könnte man schließen, dass das Kalziumsignal irgendwann in einer Zeitspanne dazwischen auftritt. Eine kontinuierliche Messung über 24h ist aufgrund des Photobleaching des Ca^{2+} -Fluoreszenzindikators nicht möglich. Daraufhin gab ich den Liganden für den

NMDA-Rezeptor Glutamat hinzu. Ich stimulierte die Zellen für 24h mit 100 ng/ml IL-17A und gab dann unmittelbar vor der Messung Glutamat hinzu.

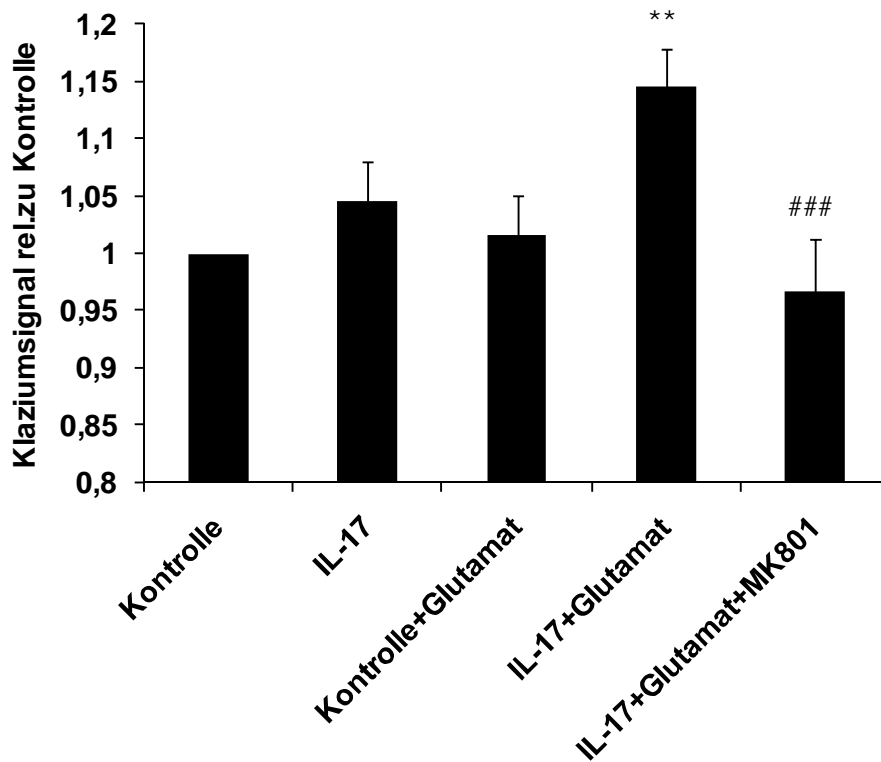


Abb.49: Kalzijsignal nach 24h IL-17A Stimulation und Zugabe von Glutamat: gibt man den Liganden Glutamat zu führt IL-17A zu einem stärkeren Kalzijsignal. MK 801 kann diesen Effekt inhibieren.

Wie schon erwähnt, ergibt sich kein signifikanter Anstieg bei IL-17A Stimulation ohne Glutamatzugabe. Gibt man den Liganden Glutamat zu und hat die Zellen zuvor mit IL-17A stimuliert, führt dies zu einem signifikant erhöhten Kalzijsignal. Dieser Effekt kann komplett durch MK 801 blockiert werden (Abb.49). Die zeigt an, dass der Kalziueinstrom über den NMDA Rezeptor erfolgt.

3.3.6 NMDA-Rezeptor Expression

Nun stellt sich die Frage, wie der gerade beschriebene Effekt zustande kommen kann, da IL-17A nicht direkt zu einem erhöhten Kalziueinstrom führt, sondern es stattdessen zu einer erhöhten Antwort auf die Ligandenbindung kommt, wenn mit IL-17A vorstimuliert wurde.

Ich untersuchte mit realtime PCR, ob nach IL-17A Stimulation die mRNA der NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors vermehrt exprimiert wird.

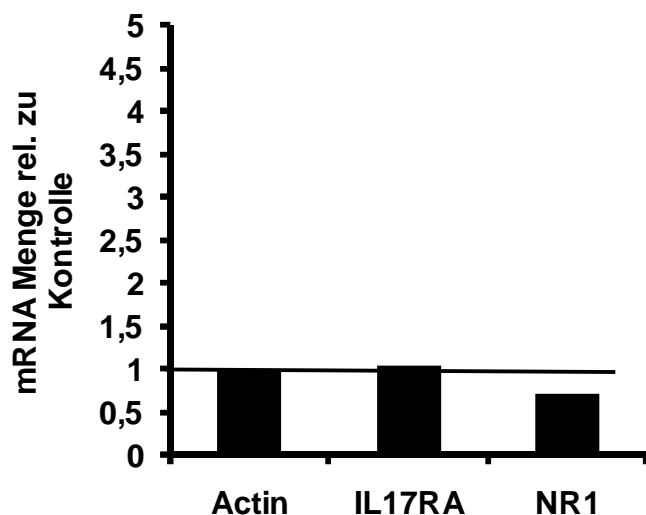


Abb.50: mRNA Expression nach IL-17A Stimulation des NR1 und IL-17RA Rezeptors: Es kommt zu keiner Änderung im Expressionslevel.

Auf mRNA Ebene wird der NMDA-Rezeptor nach 24 stündiger IL-17A Stimulation nicht hochreguliert (Abb.50). Auch der IL-17RA Rezeptor selbst ändert nicht sein Expressionslevel nach IL-17A Stimulation.

3.3.7 NMDA-Rezeptor Proteinlevel

Außerdem überprüfte ich mit In Cell western, ob die Gesamtproteinmenge an NR1 nach IL-17A Stimulation zunimmt.

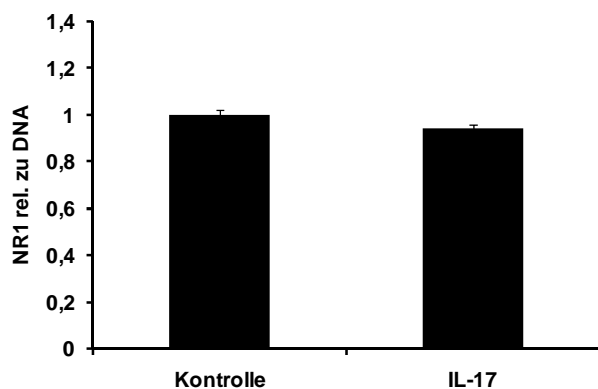


Abb.51: Proteinexpression der NR1 Untereinheit nach IL-17A Stimulation: Es kommt zu keiner Änderung des Expressionslevels.

Auch auf Proteinebene gibt es keine vermehrte NR1 Expression nach Stimulation der Zellen mit 100 ng/ml IL-17A für 24h (Abb.51).

3.3.8 NMDA-Rezeptor Phosphorylierung

Ein möglicher Aktivierungsmechanismus des NMDA-Rezeptors läuft über seine Phosphorylierung. So untersuchte ich, ob es nach IL-17A Stimulation zu einer Änderung der

Menge des phosphorylierten NR1 Proteins kommt. Hierfür verwendete ich einen Antikörper gegen die an Serin 896 phosphorylierte NR1 Untereinheit.

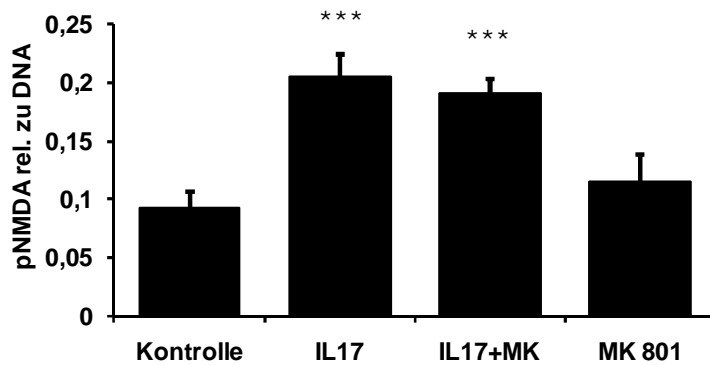


Abb.52: Proteinexpression der phosphorylierten pNR1 Untereinheit: Nach IL-17A Stimulation kommt es zu einer vermehrten Phosphorylierung der NR1 Untereinheit. Dies lässt sich nicht durch MK 801 hemmen.

Nach IL-17A Stimulation kommt es zu einer vermehrten Phosphorylierung der NR1 Untereinheit (Abb.52). Es ist bekannt, dass NMDA-Rezeptoren phosphoryliert und dephosphoryliert werden um ihre Funktion zu regulieren. Phosphorylierung verstärkt die Aktivität des Kanals (Xiong et al., 1998). NR1 Phosphorylierung an Serin 896 durch Protein Kinase C ist eines der Signale, die zur Freisetzung des Proteins aus dem endoplasmatischen Retikulum führt (Scott, 2001).

Diese Phosphorylierung lässt sich nicht durch den NMDA-Rezeptorantagonisten hemmen. So kommt es zwar bei der Kombination von IL-17A und MK 801 zur vermehrten Rezeptoraktivierung durch Phosphorylierung. Der Rezeptor wird dann aber durch MK 801 gehemmt, sodass es nicht zu einem vermehrten Kalziumeinstrom kommt.

3.3.9 Glutamatausschüttung durch BV-2 Zellen

Nun untersuchte ich noch, ob BV-2 Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-17A innerhalb von 24h Glutamat ausschütten. Ich wählte die Zeitpunkte 1, 3, 6, 18 und 24h.

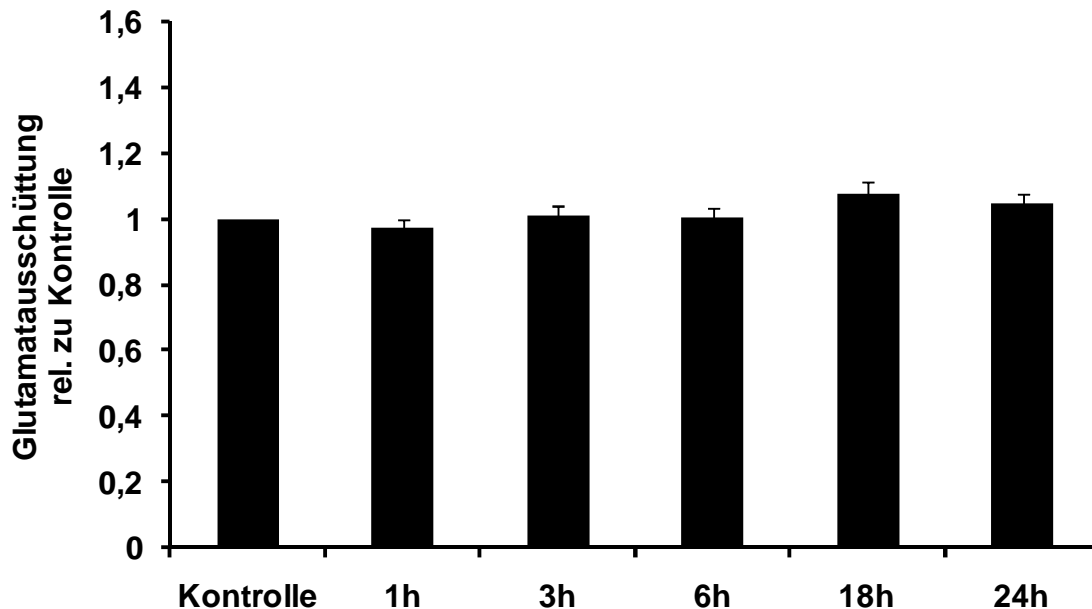


Abb.53: Glutamatausschüttung der BV-2 Zellen nach IL-17A Stimulation: Es findet keine Glutamatausschüttung innerhalb von 24h statt.

Es zeigte sich, dass BV-2 Zellen nach IL-17A Stimulation innerhalb von 24h kein Glutamat ausschütten (Abb.53).

Prinzipiell können aktivierte Mikroglia Glutamat ausschütten, was in MS und EAE zu einer Schädigung der Oligodendrozyten führt (Domercq et al., 2007, Srinivasan et al., 2005). Ebenfalls wurde kürzlich gezeigt, dass BV-2 Zellen Glutamat ausschütten können (Sivakumar et al., 2009).

3.3.10 Hemmung der Mikrogliaaktivierung in organotypischen Kulturen

Alle bisher aufgezeigten Mechanismen zur Hemmung der Aktivierung von Mikroglia durch IL-17A wurden in BV-2 Zellen gezeigt. Um zu zeigen, dass die selben Mechanismen auch an primären Mikroglia wirken, habe ich die Inhibitoren zu organotypischen Kortexkulturen gegeben, die für 24h mit 100 ng/ml IL-17A stimuliert wurden.

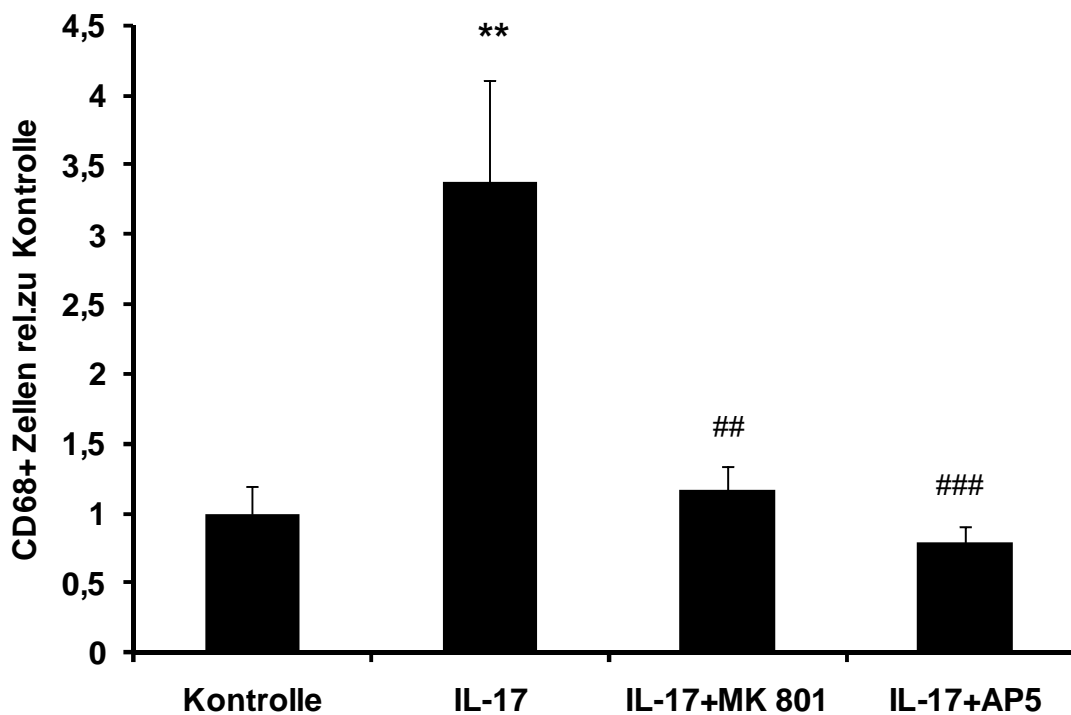


Abb.54: Hemmung der Aktivierung von Mikrogliazellen in organotypischen Kulturen durch NMDA Rezeptorinhibierung. MK801 und AP5 inhibieren die Mikrogliaaktivierung signifikant.

Wie schon in Abschnitt 3.2.1 gezeigt, führt 100 ng/ml IL-17A Stimulation für 24h zu einer vermehrten Mikrogliaaktivierung in organotypischen Kulturen. Diese Aktivierung wird durch Inhibierung des NMDA-Rezeptors vermindert (Abb.54).

4. DISKUSSION

4.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit untersuchte ich den Mechanismus, der dem IL-17A vermittelten BHS-Versagen bei EAE zugrunde liegt. Außerdem untersuchte ich die Effekte von IL-17A auf Mikroglia. Ich konnte zeigen, dass die Pathogenese von EAE durch die Hemmung des endothelialen kontraktiles Apparates mittels ML-7 gemildert werden kann. Der MLC Kinase Inhibitor ML-7 führt zu einer geringeren Menge an phosphoryliertem MLC Protein und verhindert somit die Öffnung der BHS. Dadurch können weniger Immunzellen aus der Peripherie ins ZNS einwandern. Es kommt zu einer geringeren Expression von Zytokinen und Matrixmetalloproteinasen im ZNS, und somit zu einer verminderten inflammatorischen Reaktion. Die sonst in hoher Zahl vorhandenen Th17 Zellen schütten folglich weniger IL-17A aus. Es kommt u.a. zu einer geringeren Mikrogliaaktivierung durch IL-17A. IL-17A führt zu einer verstärkten ROS Bildung in Endothelzellen und Mikrogliazellen. Außerdem fördert es die Proliferation und Migration von Mikroglia. Diese aktivierte Mikroglia schütten wiederum proinflammatorische Zytokine aus. Zusätzlich konnte ich zeigen, dass es IL-17A abhängig zu einem Kalziumeinstrom über NMDA-Rezeptoren kommt. Die Aktivierung von Mikroglia mit ihren charakteristischen Auswirkungen wie Proliferation, Migration sowie ROS- und Zytokin-Produktion kann durch die Inhibierung des NMDA-Rezeptors verhindert werden. IL-17A führt zu einer erhöhten Aktivierung des NMDA-Rezeptors, sodass es auf den Liganden Glutamat hin zu einem erhöhten Kalziumeinstrom kommt. Dieses verstärkte Kalziumsignal kann dann zusammen mit dem ebenfalls durch IL-17A ausgelösten ROS Signal zu der verstärkten Aktivierung durch IL-17A führen (Abb.55).

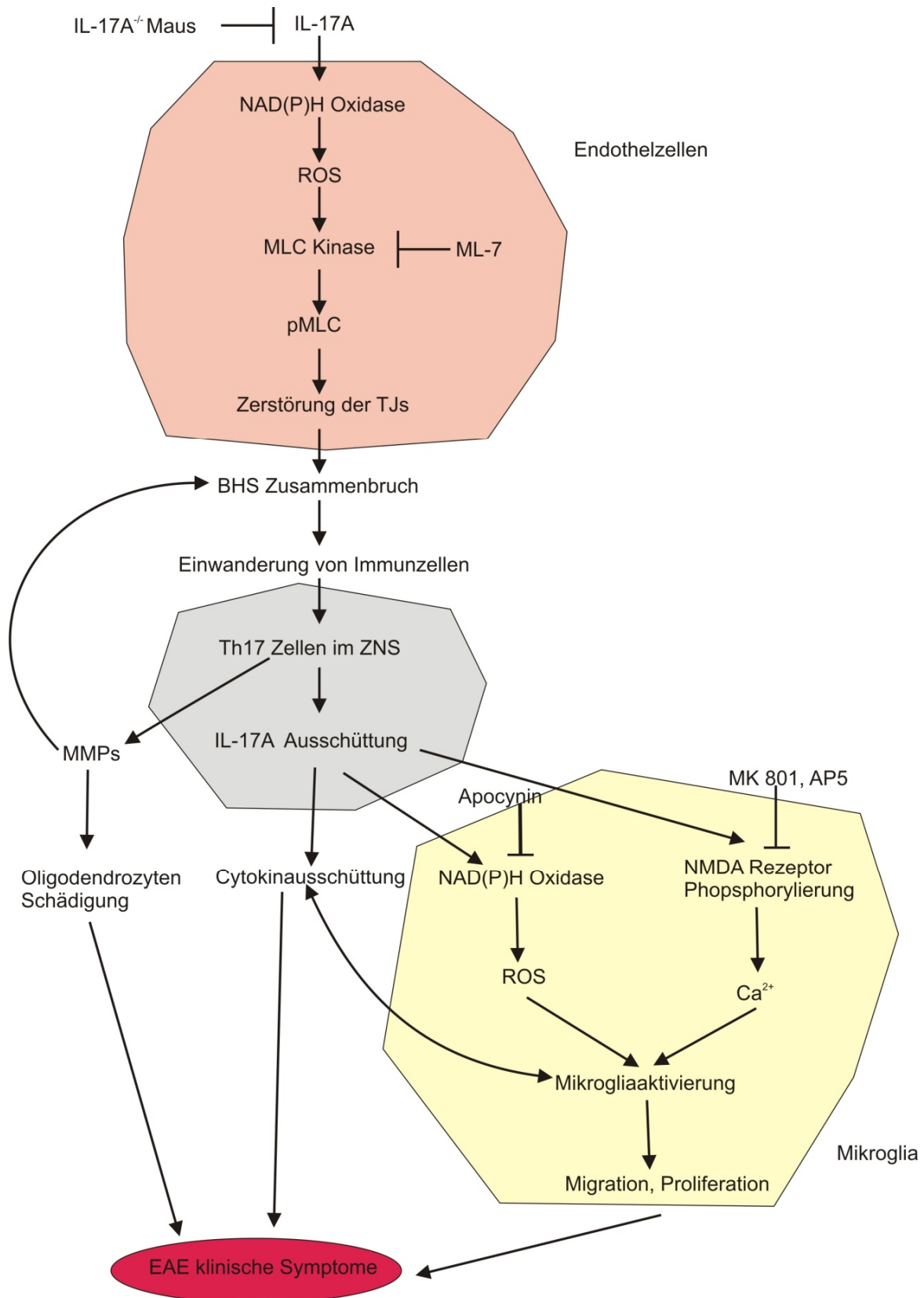


Abb.55: Zusammenfassung der Effekte von IL-17A auf die BHS und Mikroglia. IL-17A führt zum Versagen der BHS. Dies läßt sich durch Inhibierung des endothelialen kontraktiven Apparats hemmen. Außerdem führt IL-17A über ROS- und Ca²⁺-Signalwege zur Aktivierung von Mikroglia.

4.2 Einfluss des MLC Kinase Inhibitor ML-7 auf die Pathogenese von EAE

Ich konnte zeigen, dass man die Permeabilisierung der BHS in EAE durch die Inhibierung des endothelialen kontraktiven Apparates hemmen kann. Es wird angenommen, dass IL-17A oder auch andere Th17 Zytokine am Zusammenbruch der BHS beteiligt sind. Dies wurde am Zellkulturmodell gezeigt (Kebir et al., 2007; Huppert et al., 2009). Man konnte durch die Gabe von ML-7 den IL-17A vermittelten BHS-Zusammenbruch verhindern. Diese Befunde verfolgte ich *in vivo* am EAE Tiermodell für MS. Ich konnte zeigen, dass durch Gabe von ML-7 zwischen Tag 3 und 12 ein milderer klinischer Verlauf hervorgerufen wird. Um den Zusammenhang zwischen milderem klinischen Verlauf und der *in vitro* gezeigten Inhibierung des endothelialen kontraktiven Apparates und somit dem Erhalt der BHS-Integrität aufzuzeigen, verwendete ich zwei verschiedene Methoden. Sowohl die IgG Färbung als auch die Evans Blau Extravasation zeigten eine starke Störung der BHS-Integrität in EAE Tieren am Höhepunkt der Krankheit. Beide Methoden werden häufig verwendet um die Permeabilität der BHS anzuzeigen (Nicaise et al., 2009). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit vielen Studien, die den Verlust der BHS-Integrität als wichtiges Kennzeichen der EAE Pathogenese zeigten (Engelhardt, 2008; Fabis et al., 2007, van Horssen, 2008; Schreibelt et al., 2008). Ich konnte nachweisen, dass ML-7 durch die Hemmung des endothelialen kontraktiven Apparats die Öffnung der BHS reduziert. Dies steht in guter Übereinstimmung mit Kuhlmann et al. (2007). Dort wurde in Ratten gezeigt, dass ML-7 die Öffnung der BHS in einem Schlaganfall Tiermodell hemmt.

Außerdem konnte ich direkt die Menge von phosphorylierter leichter Myosinkette in Endothelzellen bestimmen. Sie ist in EAE Tieren gegenüber unimmunisierten Kontrollen erhöht und ließ sich durch ML-7 reduzieren. Somit ist die direkte Wirkung von ML-7 auf MLC gezeigt. Außerdem konnte der Zusammenhang zu IL-17A an diesem Geschehen gezeigt werden, da IL-17A^{-/-} Knock-out Mäuse während EAE viel weniger pMLC in Endothelzellen exprimieren.

Kebir et al. (2007) zeigten zusätzlich, dass die Expression von Occludin im Rückenmark von EAE Tieren reduziert ist. All diese Faktoren zeigen, dass es in EAE zu einer Störung der BHS kommt und dass der endotheliale kontraktile Apparat daran beteiligt ist. ML-7 inhibiert die MLC-Kinase, sodass es zu weniger phosphorylierter leichter Myosinkette kommt.

Es gibt einige Studien, die zeigen, dass ROS an der Pathogenese von EAE und MS beteiligt ist. Allerdings wurde vor allem gezeigt, dass antioxidative Enzyme in aktiven MS Läsionen hochreguliert sind (van Horssen et al. 2008), bzw. dass die Gabe von Antioxidantien einen positiven Effekt auf den Verlauf von EAE haben (Schreibelt et al., 2008). Ein direkter Nachweis von ROS in ZNS von EAE Tieren wurde bisher nicht erbracht. Ich konnte mit Hilfe des ROS sensitiven Farbstoffs DHE nachweisen, dass es im Gesamthomogenat des Rückenmarks von Tieren mit EAE zu einer vermehrten ROS Bildung kommt. Um die Lokalisation der ROS Produktion einzugrenzen wurden FACS Analysen durchgeführt. Diese zeigten, dass die erhöhte ROS Bildung im Vergleich zu unimmunisierten Kontrolltieren auch in den Endothelzellen des Rückenmarks vorkommt und nicht nur in Makrophagen und Mikroglia, wie man vielleicht vermuten könnte, da diese bei ihrer proinflammatorischen Reaktion ROS produzieren. Um den Zusammenhang zwischen ROS Produktion und IL-17A zu zeigen, verwendete ich IL-17A^{-/-} Knock-out Tiere. Diese zeigten eine deutlich reduzierte ROS Produktion. Haak et al. (2009) postulierten, dass IL-17A und F nicht essentiell für die Ausbildung von EAE sind. Auch ohne IL-17A, IL-17F oder einer Kombination von beiden kommt es zur Entwicklung von EAE. IL-17A^{-/-} Mäuse zeigen zwar einen milderen Krankheitsverlauf von EAE, sind aber nicht resistent.

Ich konnte zeigen, dass IL-17A am Zusammenbruch der BHS beteiligt ist und es durch Hemmung des endothelialen kontraktiven Apparates zu einem milderen klinischen Verlauf kommt. Somit kann folgender Mechanismus postuliert werden: Durch die Bindung von IL-17A an Endothelzellen kommt es zur Produktion von ROS, was zur Aktivierung der MLC Kinase führt. Diese wiederum phosphoryliert die leichte Myosinkette, wodurch es zur Kontraktion des endothelialen Apparates und zur Zerstörung von Tight junctions kommt. Beides führt zu einem Zusammenbruch der BHS und wodurch es Immunzellen aus der Blutbahn ermöglicht wird in das ZNS einzudringen.

Außerdem untersuchte ich die Expression verschiedener Gene, die in der Pathogenese von EAE eine Rolle spielen. Die mRNA Analyse erfolgte an Tag 20, dem Höhepunkt der Krankheit. Neben den klassischen Th17 Zytokine IL-17A, IL-22 und GM-CSF werden auch IL-1 β , TNF α und iNOS und die Matrixmetalloproteinasen MMP8 und MMP12 verstärkt exprimiert. In einer Arbeit von Ponomarev et al. (2007) wurde die GM-CSF Expression zu verschiedenen Zeitpunkten während des EAE Verlaufs analysiert. In Übereinstimmung mit deren Ergebnis konnte ich zeigen, dass GM-CSF im Rückenmark von unimmunisierten

Mäusen nicht detektierbar ist. Ponomarev et al. zeigten, dass die GM-CSF Expression am Tag der ersten klinischen Symptome am höchsten ist und dann wieder abnimmt, allerdings am Höhepunkt der Krankheit noch in großen Mengen exprimiert wird. Außerdem zeigten sie, dass GM-CSF von T Zellen exprimiert wird und für die Induktion von EAE benötigt wird, da ansonsten die Mikrogliaaktivierung und die Rekrutierung von peripheren Makrophagen stark inhibiert wird (Ponomarev et al., 2007).

IL-22 ist eines der Th17 Zytokine, das an der Pathogenese von EAE beteiligt ist (Betelli et al., 2007). Es wird nach IL-23 Stimulation spezifisch von den pathogenen T Zellen exprimiert (Kreymborg et al., 2007). Allerdings konnten Kreymborg et al. auch zeigen, dass IL-22^{-/-} Mäuse nicht resistent gegenüber EAE sind. Dass diese Th17 Zytokine durch ML-7 Gabe vermindert exprimiert werden, ist darauf zurückzuführen, dass weniger Th17 Zellen in das ZNS einwandern können.

Es gibt 23 Matrixmetalloproteinasen in der Maus. Einige davon werden in EAE hochreguliert. Ich konnte diese Hochregulierung im Rückenmark am Höhepunkt der Krankheit bei MMP8 und 12 detektieren. Die von mir auch untersuchten Gene MMP2, 9 und 10 werden nicht hochreguliert. Toft-Hansen et al. (2004) zeigten eine Hochregulation von MMP8, 10 und 12. MMP2 und 9 werden auch in dieser Studie nicht hochreguliert. Allerdings arbeitete die Gruppe mit SJL/J Mäusen mit passiver EAE. Dies könnte den Unterschied bei MMP10 erklären. Weaver et al. (2005) detektierten in 129/SvEv Mäusen, welche eine schubförmige EAE zeigen, besonders eine Hochregulierung von MMP12, was mit meinen Ergebnissen gut übereinstimmt. Außerdem zeigen sie eine Hochregulierung von MMP3, 8, 10, 19 und 25. Die starke Hochregulierung von MMP12 konnte ich durch die Gabe von ML-7 hemmen.

Es wurde häufiger gezeigt, dass TNF α in EAE hochreguliert wird (z.B. Espejo et al., 2005). Dies konnte ich bei meiner Analyse bestätigen. Zudem konnte ich die TNF α Hochregulierung durch ML-7 hemmen. Dieser Effekt ist wahrscheinlich sekundär. Wird die Öffnung der BHS gehemmt, können weniger Immunzellen aus der Peripherie in das ZNS eindringen. Es kommt zu einer geringeren Entzündungsreaktion und dadurch zu einer geringeren Expressionsrate der Zytokine.

In EAE Tieren konnten wir eine verstärkte Mikrogliaaktivierung detektieren. Dissing-Olesen et al. (2007) zeigten, dass ICAM außer auf Endothelzellen auch auf aktivierten Mikroglia exprimiert wird und als Marker für diese verwendet werden kann. Nach ZNS Verletzung und in EAE Mäusen wiesen sie eine vermehrte ICAM-Expression nach. Dies deckt sich mit den

Resultaten unseren immunhistochemischen Färbungen. Es wurde häufig gezeigt, dass Mikroglia in EAE und auch MS eine wichtige Rolle spielen (z.B. Benviste, 1997, Smith, 2001, Neumann et al., 2009). Auch die ICAM-Expression kann durch ML-7 gehemmt werden. Da es durch die verminderte Öffnung der BHS zu einer verminderten Einwanderung spezifischer T-Zellen gegen MOG kommt, führt dies zu einem geringeren Schaden im ZNS und somit zu einer geringeren Mikrogliaaktivierung.

4.3 Wirkung von IL-17A auf Mikroglia

Ich konnte zeigen, dass Th17 Zytokine murine Mikroglia aktivieren. Wie oben schon beschrieben, sekretieren Th17 Zellen IL-17A und F, IL-6, IL-22 und GM-CSF. Diese Zytokine spielen in Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose und dem Tiermodell EAE eine wichtige Rolle. CD68 ist ein Oberflächenmarker für aktivierte Mikroglia und Makrophagen. Zytokine werden z.B. von Lymphozyten ausgeschüttet und führen dann zur Aktivierung von Mikroglia. Ich konnte zeigen, dass exogenes IL-17A und F sowie IL-6 zu einer signifikanten Aktivierung von Mikroglia im murinen Kortex führen. Kawanokuchi et al. (2008) konnten den IL-17A Rezeptor auf primären murinen Mikroglia nachweisen und auch zeigen, dass er funktional ist, da es in Folge von IL-17A Stimulation zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen kommt. Ebenfalls in guter Übereinstimmung mit Kawanokuchi konnte ich zeigen, dass der Effekt von IL-17A dosisabhängig ist. 1 ng/ml IL-17A zeigt keinen Effekt, 10 ng/ml IL-17A einen leichten und mit 100 ng/ml wird ein signifikanter Effekt erreicht.

Die genaueren Wirkungsmechanismen, die IL-17A auf Mikroglia hat, wurden bisher noch nicht untersucht. Um sie an einem vereinfachten Modell studieren zu können, arbeitete ich mit der murinen Mikroglia-Zelllinie BV-2. Diese zeigt die charakteristischen Eigenschaften von Mikroglia und lässt sich gut aktivieren, was sich in ihrer Morphologie und Funktion niederschlägt (Bocchini et al., 1992, Laurenzi et al., 2001). Ich konnte zeigen, dass diese Mikroglia-Zelllinie auch den IL-17RA Rezeptor exprimiert.

Ein Charakteristikum von aktivierten Mikroglia ist ihre ROS Produktion. Ich konnte zeigen, dass 100 ng/ml IL-17A zu einer erhöhten ROS Produktion nach 24h durch BV-2 Zellen führt. In Huppert et al. (2009) wurde gezeigt, dass die IL-17A vermittelte ROS Produktion in

Endothelzellen vor allem durch die NAD(P)H Oxidase entsteht. In Mikroglia konnte ich nun die ROS Produktion durch Apocynin, einem Inhibitor der NAD(P)H Oxidase hemmen und somit die NAD(P)H Oxidase als Quelle der ROS Produktion identifizieren. Dies ist auch in Übereinstimmung mit Mander et al. (2006), die die NAD(P)H Oxidase als Quelle von ROS bei der Proliferation von Mikroglia identifizierten. Die NAD(P)H Oxidase kann sowohl Superoxid als auch Wasserstoffperoxid generieren. Um abzugrenzen, welche der beiden Substanzen von den BV-2 Zellen als Antwort auf die IL-17A Stimulation produziert wird, gab ich sowohl SOD (wandelt Superoxid zu Wasserstoffperoxid um) als auch Katalase (spaltet Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff) hinzu. Im Gegensatz zu Mander et al. konnte ich zeigen, dass die SOD den Effekt von IL-17A auf die ROS Bildung vollständig aufhebt, wohingegen Katalase nur einen sehr geringen Effekt hat. Somit kann ich folgern, dass vor allem Superoxid in Folge von IL-17A Stimulation gebildet wird. Mander et al. zeigten hingegen, dass vor allem Wasserstoffperoxid gebildet wird.

Aktivierte Mikroglia proliferieren und migrieren. Deshalb analysierte ich, ob IL-17A einen Einfluss auf diese Faktoren hat. Ich konnte zeigen, dass es nach 24h zu einer vermehrten Proliferation mit 100 ng/ml IL-17A kommt, die sich nach 48h und 72h verstärkt zeigt. Dies ergänzt die Daten, die von Mander et al. erhoben wurden, welche zeigen, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α nach 72h zu einer verstärkten Mikroglia proliferation führen. Diese verstärkte Proliferation konnte ich durch die Hemmung der ROS Produktion inhibieren. Somit zeigte ich, dass ROS zur Proliferation von Mikroglia führt, was in Übereinstimmung zu Mander et al. steht, auch wenn es sich hierbei um eine andere Art ROS handelt.

Außerdem konnte ich zeigen, dass IL-17A zu einer verstärkten Migration von Mikroglia führt. Nach 18h Migrationszeit konnte ich mit 100 ng/ml IL-17A eine vermehrte Migration auf 236% feststellen. Als Positivkontrolle verwendete ich fMLP, eine häufig verwendete chemoattraktive Substanz. Diese führt zu einer etwas stärkeren Migration als IL-17A, nämlich von 273% im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Diese Werte sind vergleichbar mit denen, die Forstreuter et al. (2002) erzielt haben, als sie die Migration von BV-2 Zellen in Reaktion auf VEGF untersucht haben. Somit kann man folgern, dass IL-17A einen wesentlich migrationsfördernden Effekt auf Mikroglia hat. Obendrein kann ausgeschlossen werden, dass aufgrund höherer Zellzahlen eine scheinbar gestiegene Migrationsrate zu verzeichnen ist. Der

Zeitpunkt nach welchem der Migrationsversuch gestoppt wurde (18h), liegt deutlich unter demjenigen, bei dem eine deutlich erhöhte Proliferation gemessen werden konnte (48h).

Wie bei der Proliferation konnte ich auch bei der Migration einen Zusammenhang zur ROS Bildung herstellen. Wird die Quelle der ROS Produktion gehemmt oder ROS eliminiert, konnte ich die durch IL-17A hervorgerufene verstärkte Migration aufheben.

4.4 Beteiligung des NMDA-Rezeptors an der IL-17A vermittelten Mikrogliaaktivierung

Ich konnte zeigen, dass bei der Aktivierung von Mikroglia NMDA-Rezeptoren beteiligt sind. Es lässt sich sowohl die ROS Bildung, als auch die Proliferation durch Inhibitoren des NMDA Rezeptors hemmen.

Ich konnte zeigen, dass nach IL-17A Stimulation die Zytokine IL-6 und G-CSF vermehrt sekretiert werden. Im Gegensatz dazu, werden diese zwei Zytokine auf mRNA Ebene nicht vermehrt exprimiert. Dies deutet auf eine vermehrte Proteinfreisetzung oder postranslationale Modifikationen hin, sodass mehr Protein verfügbar ist und sekretiert wird. Es ist bekannt, dass IL-6 von Mikroglia sekretiert wird und an der Initialisierung und Koordinierung inflammatorischer Reaktionen im ZNS beteiligt ist. IL-6 soll vor allem in der frühen Phase nach ZNS Verletzungen aktiv werden und auf Astrozyten wirken, die im Gegensatz zu Mikroglia den IL-6 Rezeptor exprimieren (Hanisch 2002, Raivich et al., 1999).

G-CSF zeigt vor allem anti-inflammatorische Wirkung und moduliert die Immunreaktion, die durch IL-1, TNF α und IFN γ hervorgerufen wird. Es wird berichtet, dass G-CSF die neurologische Erholung nach Schlaganfall beschleunigt, indem es zur Aktivierung von Mikroglia führt (Sanchez-Ramos et al., 2009, Komine-Kobayashi et al, 2006).

Die Freisetzung beider Zytokine lässt sich durch den NMDA-Rezeptor-Inhibitor AP5 reduzieren. Dies zeigt wiederum eine Beteiligung der NMDA-Rezeptoren an der IL-17A vermittelten Mikrogliaaktivierung an.

Über die Beteiligung von NMDA-Rezeptoren und folglich Kalziumsignale in Mikroglia ist wenig bekannt. Ihre Funktion in Neuronen ist hingegen sehr gut untersucht und auch zu Makroglia und NMDA-Rezeptoren gibt es einige Untersuchungen (Verkhatsky, Kirchhoff 2007). Färber und Kettenmann (2006) beschreiben die verschiedenen Funktionen und Signalwege von Kalzium in Mikrogliazellen, erwähnen aber, dass der NMDA-Rezeptor wohl keine Rolle spielt. Nur Hiriyama und Kuriyama (2001) hatten beschrieben, dass der NMDA-

Rezeptor-Inhibitor MK 801 in höheren Dosen direkt toxisch auf Mikrogliazellen wirkt und folgerten daraus, dass der Rezeptor exprimiert ist. Ich verwendete 10 μM MK 801, das auch in der Studie von Hirayama und Kuriyama kaum die Zellüberlebensrate beeinträchtigte.

So wollte ich die direkte Funktionalität des NMDA-Rezeptors auf BV-2 überprüfen, indem ich den intrazellulären Kalziumgehalt mit Hilfe des kalziumsensitiven Farbstoffs Fluo-3 ermittelte. Werden die Zellen für 24h mit IL-17A vorinkubiert und wird dann der Ligand des NMDA-Rezeptors Glutamat hinzugegeben, kommt es zu einem erhöhten Kalziumsignal. Dieses lässt sich durch die Zugabe von MK 801 hemmen, was auf die Beteiligung des NMDA-Rezeptors schließen lässt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch andere Ca^{2+} Kanäle beteiligt sind, da ich keine anderen Inhibitoren einsetzte. Dies könnte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

Nun stellte sich die Frage, wie IL-17A zum erhöhten Kalziumeinstrom durch NMDA-Rezeptoren führt. Ein direkter Effekt auf Mikroglia kann ausgeschlossen werden, da es ohne die Zugabe vom Liganden Glutamat zu keinem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom führt. Eine einfache Erklärung wäre, dass IL-17A zu einer vermehrten Rezeptorexpression führt, wodurch eine größere Anzahl von Kanälen an der Zelloberfläche vorhanden sind und somit die Antwort auf ein Glutamatsignal hin größer wäre. Ich konnte jedoch sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene keine erhöhte Expression des NMDA-Rezeptors nachweisen. Es ist bekannt, dass der Aktivierungsgrad des NMDA-Rezeptors durch die Phosphorylierung am Serin-896 reguliert werden kann. Xiong et al. (1998) haben gezeigt, dass Phosphorylierung die Aktivität des Kanals in hippocampalen Neuronen verstärkt. Guo und Huang (2001) konnten einen Zusammenhang zwischen Inflammation und vermehrter Phosphorylierung durch Proteinkinase C in Neuronen herstellen. Brenner et al. (2004) untersuchten genauer, dass die Untereinheit NR1 am Serin-896 nach Hitzeschmerz phosphoryliert wird und dass dies zur Freisetzung des Proteins aus dem ER führt. Allerdings sind dies alles Befunde aus Neuronen. Ich konnte in Mikroglia zeigen, dass es nach IL-17A Stimulation zu einem erhöhten Anteil an phosphorylierter NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors kommt, wobei die Gesamtproteinmenge konstant bleibt. Dies kann erklären, dass mehr aktive Kanäle an der Zelloberfläche vorhanden sind, die nach Ligandenbindung dann zu einem höheren Kalziumeinstrom führen als ohne IL-17A Stimulation. Allerdings ist dieser Effekt nicht durch die Zugabe des NMDA-Rezeptor Inhibitor MK 801 hemmbar. Dies steht im Gegensatz zu dem Befund von Brenner et al., bei dem MK 801 die Phosphorylierung der NR1 Untereinheit in Neuronen nach Hitzeschmerz verminderte. Man kann annehmen, dass es

in Mikroglia zu einer vermehrten Phosphorylierung des NMDA-Rezeptors kommt, die unabhängig von MK 801 ist. Für die Funktionalitätstests bewirkt die Zugabe von MK 801 dann aber, dass der Kanal gehemmt wird und es nicht zum Kalziumeinstrom kommt.

Eine weitere Fragestellung war, ob Mikroglia und speziell BV-2 Zellen Glutamat als Antwort auf IL-17A ausschütten. Ich konnte keine Glutamatausschüttung innerhalb einer Zeitspanne zwischen 1 und 24h nach IL-17A Stimulation detektieren. Domercq et al. (2007) zeigten, dass aktivierte Mikroglia nach LPS Stimulation Glutamat ausschütten, und zwar über den Cystin-Glutamat-Austauscher. Dies kann die erhöhte Glutamatkonzentration in aktiven Läsionen von MS erklären (Srinivasan et al., 2005), da es durch die hohe Glutamatkonzentration zu einer Schädigung von Oligodendrozyten kommt. Ein Argument wäre, dass zwar primäre Mikroglia Glutamat ausschütten können, aber nicht BV-2 Zellen. Doch wurde kürzlich gezeigt, dass auch BV-2 Zellen Glutamat ausschütten können. Sivakumar et al. (2009) zeigten, dass BV-2 Zellen und primäre Mikroglia unter Hypoxie vermehrt Glutamat ausschütten. Somit ist gezeigt, dass BV-2 Zellen zwar in der Lage sind als Modell für Mikroglia auch in Hinblick auf Glutamatausschüttung zu dienen, aber IL-17A nicht zu diesem Effekt führt. Es bleibt zu untersuchen, ob IL-17A in primären murinen Mikroglia zur Glutamatausschüttung führt.

5. AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde die Funktion des NMDA-Rezeptors auf Mikrogliazellen am Beispiel von IL-17 Stimulation untersucht. Es ist bekannt, dass die Blockade von NMDA-Rezeptoren in EAE zu einem milderem klinischen Verlauf und einer Reduktion des BHS Versagens führt (Bolton, Paul, 1997; Paul, Bolton, 2002; Wallström et al., 1996). Allerdings sind Studien an MS Patienten bisher gescheitert (Villoslada et al., 2009). Ein möglicher Grund wäre, dass die Blockade nicht selektiv erfolgte. Deshalb wäre es interessant zu untersuchen, welche Zellen, die den NMDA-Rezeptor exprimieren, für die EAE Pathogenese relevant sind. Die hier vorgelegte Arbeit beschränkte sich auf Mikrogliazellen. Ebenso könnten Astrozyten und Oligodendrozyten eine wichtige Rolle spielen. Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass der Zusammenbruch der BHS essentiell für die Entwicklung von EAE ist. Außerdem ist bekannt, dass durch Blockade der NMDA-Rezeptoren auf Endothelzellen die Schrankenintegrität erhalten werden kann (Kuhlmann et al., 2008). In diesem Zusammenhang sollten auch die Endothelzellen näher untersucht werden. Hier könnte es besonders interessant sein, die Untereinheitszusammensetzung näher zu analysieren. Man könnte die

Expressionsmuster der verschiedenen Untereinheiten nach Stimulation mit IL-17 in Glia- und Endothelzellen sowie im Verlauf der EAE Pathogenese analysieren. Somit könnten selektivere Ansätze zur Hemmung des BHS-Versagens in EAE und MS gefunden werden.

Da ich außerdem eine konditionale IL-17RA Knockout Maus generiert habe, könnte man den Einfluss von IL-17A auf die BHS-Integrität in EAE genauer untersuchen. Dazu müsste diese Maus mit Cre Stämmen verpaart werden, die spezifisch für Endothelzellen oder Astrozyten sind, um selektiv in diesen Zellarten den IL-17RA Rezeptor auszuschalten. Somit könnte man den Einfluss von IL-17A in EAE untersuchen, ohne in das Netzwerk von Immunzellen einzugreifen.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
μ	Mikro
Abb	Abbildung
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ANOVA	Analysis of variance
APC	Antigen presenting cell
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirnschranke
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
Ca	Kalzium
ca.	Circa
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CFA	Komplettes Freund's Adjuvans
Cl	Chlor
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
Cp	Crossing point
CSF	Cerebrospinal fluid
d.h.	Das heißt
Da	Dalton
DCFH	2'7'dichlorodihydrofluorescein
DHE	Dihydroethidin
div	Days <i>in vitro</i>
DNA	Desoxiribonuceic acid
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
ECM	Extracellular matrix
et al.	Et alii
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum

FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
fMLP	Formyl-Metyl-Leucyl-Phenyl
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
ggf.	Gegebenenfalls
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HBSS	Hanks buffered salt solution
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
JAM	Junctional adhesion molecule
k	Kilo
LEA	Lycopersicon esculentum agglutinin
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli
M	Molar
m	Meter
MAG	Myelin-associated glycoprotein
MBP	Myelin basic protein
MEM	Minimal essential medium
Mg	Magnesium
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
MLC	Myosin light chain
MLCK	Myosin light chain kinase
MMP	Matrixmetalloproteinase

MOG	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
MRI	Magnetic resonance imaging
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MS	Multiple Sklerose
n	Nano
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NB	Neurobasalmedium
NF κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffoxid
NR1	NMDA Rezeptor Untereinheit 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid Protein
RFU	Relative fluorescence unit
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Revolutions per minute
SOD	Superoxiddismutase
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEER	Trans epithelial electric resistance
TGF β	Transforming growth factor β
Th Zelle	T Helferzelle
TJ	Tight junctions
TNF α	Tumornekrosisfaktor α
Treg	Regulatorische T Zellen
TRP	Transient receptor potential channels
U	Unit
VEGF	Vascular endothelial growth factor
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Literaturverzeichnis

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41–53.
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie M, Sauvage FJ de, Gurney AL (2003) Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 278:1910–1914.
- Aggarwal S, Gurney AL (2002) IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J. Leukoc. Biol.* 71:1–8.
- Backes MG, Lund RD, Lagenaur CF, Kunz HW, Gill TJ (1990) Cellular events associated with peripherally induced rejection of mature neural xenografts placed into neonatal rat brains. *J. Comp. Neurol.* 295:428–437.
- Baxter AG (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7:904–912.
- Becher B, Durell BG, Noelle RJ (2002) Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J. Clin. Invest.* 110:493–497.
- Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR (1981) The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 11:195–199.
- Benveniste EN (1997) Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J. Mol. Med.* 75:165–173.
- Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2007) TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8:345–350.
- Betzen C, White R, Zehendner CM, Pietrowski E, Bender B, Luhmann HJ, Kuhlmann CRW (2009) Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium. *Free Radic. Biol. Med.* 47:1212–1220.
- Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F (1990) Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J. Neuroimmunol.* 27:229–237.
- Block ML (2008) NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC neuroscience* 9 Suppl 2:S8.
- Bo L, Vedeler CA, Nyland H, Trapp BD, Mork SJ (2003) Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Multiple Sclerosis* 9:323–331.
- Bö L, Mörk S, Kong PA, Nyland H, Pardo CA, Trapp BD (1994) Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* 51:135–146.
- Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Blasi E, Sick P, Kettenmann H (1992) An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J. Neurosci. Res.* 31:616–621.
- Bolton C, Paul C (1997) MK-801 Limits Neurovascular Dysfunction during Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282:397–402.
- Broman T (1964) Blood-brain barrier damage in multiple sclerosis supravital test-observations. *Acta Neurol. Scand., Suppl.* 40:SUPPL 10:21-4.
- Brüstle A, Heink S, Huber M, Rosenplanter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, Mak TW, Kamradt T, Lohoff M (2007) The development of inflammatory TH-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 8:958–966.
- Cannella B, Raine CS (1995) The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 37:424–435.
- Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause K (2005) Chemokine receptors in the central nervous system:

- role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews* 48:16–42.
- Chang SH, Park H, Dong C (2006) Act1 Adaptor Protein Is an Immediate and Essential Signaling Component of Interleukin-17 Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 281:35603–35607.
- Chinta SJ, Andersen JK (2008) Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1780:1362–1367.
- Clements JM, Cossins JA, Wells GMA, Corkill DJ, Helfrich K, Wood LM, Pigott R, Stabler G, Ward GA, Gearing AJH, Miller KM (1997) Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune encephalomyelitis and effects of a combined matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor-[alpha] inhibitor. *Journal of Neuroimmunology* 74:85–94.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744–748.
- DaSilva AG, Yong VW (2008) Expression and regulation of matrix metalloproteinase-12 in experimental autoimmune encephalomyelitis and by bone marrow derived macrophages in vitro. *Journal of Neuroimmunology* 199:24–34.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan W (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8:752–758.
- Dissing-Olesen L, Ladeby R, Nielsen HH, Toft-Hansen H, Dalmau I, Finsen B (2007) Axonal lesion-induced microglial proliferation and microglial cluster formation in the mouse. *Neuroscience* 149:112–122.
- Dong C (2008) TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 8:337–348.
- Ebnet K, Aurrand-Lions M, Kuhn A, Kiefer F, Butz S, Zander K, Brickwedde MM zu, Suzuki A, Imhof BA, Vestweber D (2003) The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci* 116:3879–3891.
- Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J. Neurosci.* 16:2508–2521.
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58:39–46.
- Engelhardt B (2008) Immune cell entry into the central nervous system: Involvement of adhesion molecules and chemokines. *Treatment Targets in Multiple Sclerosis: 'The ends and the means', European Charcot Foundation Symposium 2007. Journal of the Neurological Sciences* 274:23–26.
- Engelhardt B, Ransohoff RM (2005) The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends in Immunology* 26:485–495.
- Engelhardt B, Wolburg H (2004) Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur. J. Immunol.* 34:2955–2963.
- Espejo C, Penkowa M, Demestre M, Montalban X, Martínez-Cáceres EM (2005) Time-course expression of CNS inflammatory, neurodegenerative tissue repair markers and metallothioneins during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience* 132:1135–1149.
- Fabis MJ, Scott GS, Kean RB, Koprowski H, Hooper DC (2007) Loss of blood-brain barrier integrity in the spinal cord is common to experimental allergic encephalomyelitis in knockout mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:5656–5661.
- Färber K, Kettenmann H (2006) Functional role of calcium signals for microglial function. *Glia* 54:656–665.
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997) Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*

120:393–399.

- Fetler L, Amigorena S (2005): Brain Under Surveillance: The Microglia Patrol. *Science* 309:392–393.
- Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H (2001) Migratory Activity and Functional Changes of Green Fluorescent Effector Cells before and during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Immunity* 14:547–560.
- Forstreuter F, Lucius R, Mentlein R (2002) Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. *Journal of Neuroimmunology* 132:93–98.
- Freund J, Thomson KJ (1945) A simple, rapid technic of preparing water-in-oil emulsions of penicillin, drugs and biologics. *Science* 101:468–469.
- Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR (2007) Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmunity reviews* 6:169–175.
- Garden GA, Möller T (2006) Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 1:127–137.
- Gardinier MV, Amiguet P, Linington C, Matthieu JM (1992) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J. Neurosci. Res.* 33:177–187.
- Gijbels K, Proost P, Masure S, Carton H, Billiau A, Opdenakker G (1993) Gelatinase B is present in the cerebrospinal fluid during experimental autoimmune encephalomyelitis and cleaves myelin basic protein. *J. Neurosci. Res.* 36:432–440.
- 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* 129:1953–1971.
- Guo H, Huang LY (2001) Alteration in the voltage dependence of NMDA receptor channels in rat dorsal horn neurones following peripheral inflammation. *J. Physiol. (Lond.)* 537:115–123.
- Haak S, Croxford AL, Kreymborg K, Heppner FL, Pouly S, Becher B, Waisman A (2009) IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* 119:61–69.
- Hanisch U (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140–155.
- Haorah J, Heilman D, Knipe B, Chrastil J, Leibhart J, Ghorpade A, Miller DW, Persidsky Y (2005) Ethanol-induced activation of myosin light chain kinase leads to dysfunction of tight junctions and blood-brain barrier compromise. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29:999–1009.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005) Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6:1123–1132.
- Hartshorne DJ, Ito M, Erdödi F (2004) Role of Protein Phosphatase Type 1 in Contractile Functions: Myosin Phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 279:37211–37214.
- Hawkins BT, Davis TP (2005) The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacological Reviews* 57:173–185.
- Hirayama M, Kuriyama M (2001) MK-801 is cytotoxic to microglia in vitro and its cytotoxicity is attenuated by glutamate, other excitotoxic agents and atropine: Possible presence of glutamate receptor and muscarinic receptor on microglia. *Brain Research* 897:204–206.
- Hixenbaugh EA, Goeckeler ZM, Papaiya NN, Wysolmerski RB, Silverstein SC, Huang AJ (1997) Stimulated neutrophils induce myosin light chain phosphorylation and isometric tension in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273:H981–988.
- Hochmeister S, Grundtner R, Bauer J, Engelhardt B, Lyck R, Gordon G, Korosec T, Kutzelnigg A, Berger JJ, Bradl M, Bittner RE, Lassmann H (2006) Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65:855–865.

- Honda S, Nakajima K, Nakamura Y, Imai Y, Kohsaka S (1999) Rat primary cultured microglia express glial cell line-derived neurotrophic factor receptors. *Neuroscience Letters* 275:203–206.
- Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S (2001) Extracellular ATP or ADP Induce Chemotaxis of Cultured Microglia through Gi/o-Coupled P2Y Receptors. *J. Neurosci.* 21:1975–1982.
- Huang F, Kao C, Wachi S, Thai P, Ryu J, Wu R (2007) Requirement for Both JAK-Mediated PI3K Signaling and ACT1/TRAF6/TAK1-Dependent NF- κ B Activation by IL-17A in Enhancing Cytokine Expression in Human Airway Epithelial Cells. *J Immunol* 179:6504–6513.
- Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, Bechmann I, Becher B, Luhmann HJ, Waisman A, Kuhlmann CRW (2009) Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.*
- Ihara E, MacDonald JA (2007) The regulation of smooth muscle contractility by zipper-interacting protein kinase. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 85:79–87.
- Ivanov S, Lindén A (2009) Interleukin-17 as a drug target in human disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 30:95–103.
- Jones DP (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C849-868.
- Kabat EA, Wolf A, Bezer AE, Murray JP (1951) Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *J. Exp. Med.* 93:615–633.
- Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A (2008) Production and functions of IL-17 in microglia. *J. Neuroimmunol.* 194:54–61.
- Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A (2007) Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* 13:1173–1175.
- Kermode AG, Thomson AJ, Toft P, Macmanus DG, Kendal BE, Kingsley DPE, Mosely IF, Rudge P, MacDonald WI (1990) Breakdown of the blood-brain barrier precedes symptoms and other MRI signs of new lesions in multiple sclerosis: pathogenetic and clinical implications. *Brain* 113:1477–1489.
- Kieseier BC, Kiefer R, Clements JM, Miller K, Wells GM, Schweitzer T, Gearing AJ, Hartung HP (1998) Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 121:159–166.
- Kieseier BC, Hartung H (2003) Current Disease-Modifying Therapies in Multiple Sclerosis. *Semin Neurol* 23:133–146.
- Kim SU, Vellis J de (2005) Microglia in health and disease. *J. Neurosci. Res.* 81:302–313.
- Koehler RC, Gebremedhin D, Harder DR (2006) Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol* 100:307–317.
- Kolls JK, Lindén A (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21:467–476.
- Komine-Kobayashi M, Zhang N, Liu M, Tanaka R, Hara H, Osaka A, Mochizuki H, Mizuno Y, Urabe T (2005) Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:402–413.
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 177:566–573.
- Konno H, Yamamoto T, Iwasaki Y, Saitoh T, Suzuki H, Terunuma H (1989) Ia-expressing microglial cells in experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Acta Neuropathol.* 77:472–479.
- Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H (2000) Multiple Sclerosis and Chronic Autoimmune Encephalomyelitis. A Comparative Quantitative Study of Axonal Injury in Active, Inactive, and Remyelinated Lesions. *Am J Pathol* 157:267–276.
- Kreymborg K, Etzensperger R, Dumoutier L, Haak S, Rebollo A, Buch T, Heppner FL, Renaud J, Becher B (2007) IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 179:8098–8104.

- Kuhlmann CRW, Tamaki R, Gamerding M, Lessmann V, Behl C, Kempinski OS, Luhmann HJ (2007) Inhibition of the myosin light chain kinase prevents hypoxia-induced blood-brain barrier disruption. *J. Neurochem.* 102:501–507.
- Kuhlmann CRW, Zehendner CM, Gerigk M, Closhen D, Bender B, Friedl P, Luhmann HJ (2009) MK801 blocks hypoxic blood-brain-barrier disruption and leukocyte adhesion. *Neuroscience Letters* 449:168–172.
- Kutzelnigg A, Lassmann H (2006) Cortical demyelination in multiple sclerosis: A substrate for cognitive deficits? *Cognitive Decline in Multiple Sclerosis: Biological, Clinical and Therapeutic Aspects - European Charcot Foundation Symposium. Journal of the Neurological Sciences* 245:123–126.
- Lai C, Kuo K, Leo JM (2005) Critical role of actin in modulating BBB permeability. *Brain Research Reviews* 50:7–13.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201:233–240.
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2007) The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 17:210–218.
- Laurenzi MA, Arcuri C, Rossi R, Marconi P, Bocchini V (2001) Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2. *Neurochem. Res.* 26:1209–1216.
- Leppert D, Ford J, Stabler G, Grygar C, Lienert C, Huber S, Miller KM, Hauser SL, Kappos L (1998) Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 121:2327–2334.
- Leppert D, Lindberg RLP, Kappos L, Leib SL (2001) Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Research Reviews* 36:249–257.
- Li H, Cuzner ML, Newcombe J (1996) Microglia-derived macrophages in early multiple sclerosis plaques. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 22:207–215.
- Liedtke W, Cannella B, Mazzaccaro RJ, Clements JM, Miller KM, Wucherpfennig KW, Gearing AJ, Raine CS (1998) Effective treatment of models of multiple sclerosis by matrix metalloproteinase inhibitors. *Ann. Neurol.* 44:35–46.
- Linden A (2007) A Role for the Cytoplasmic Adaptor Protein Act1 in Mediating IL-17 Signaling. *Sci. STKE* 2007:re4.
- Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L (2002) Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8:500–508.
- Lum H, Roebuck KA (2001) Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C719–741.
- Mander PK, Jekabsone A, Brown GC (2006) Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *J. Immunol.* 176:1046–1052.
- Martinez GJ, Nurieva RI, Yang XO, Dong C (2008) Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1143:188–211.
- Matusevicius D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H (1999) Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 5:101–104.
- Minghetti L, Levi G (1998) Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Progress in Neurobiology* 54:99–125.

- Mitic LL, Anderson JM (1998) Molecular architecture of tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 60:121–142.
- Miyake M, Sasaki K, Ide K, Matsukura Y, Shijima K, Fujiwara D (2006) Highly Oligomeric Procyanidins Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via Suppression of Th1 Immunity. *J Immunol* 176:5797–5804.
- Mizoguchi Y, Monji A, Kato T, Seki Y, Gotoh L, Horikawa H, Suzuki SO, Iwaki T, Yonaha M, Hashioka S, Kanba S (2009) Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Induces Sustained Elevation of Intracellular Ca²⁺ in Rodent Microglia. *J Immunol:jimmunol.0901326*.
- Moller T, Nolte C, Burger R, Verkhratsky A, Kettenmann H (1997) Mechanisms of C5a and C3a Complement Fragment-Induced [Ca²⁺]_i Signaling in Mouse Microglia. *J. Neurosci.* 17:615–624.
- Monteleone I, Pallone F, Monteleone G (2009) Interleukin-23 and Th17 cells in the control of gut inflammation. *Mediators Inflamm.* 2009:297645.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348–2357.
- Möller T, Weinstein JR, Hanisch U (2006) Activation of Microglial Cells by Thrombin: Past, Present, and Future. *Semin Thromb Hemost* 32:69–76.
- Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel Á, Tanaka K, Niwa M (2009) A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochemistry International* 54:253–263.
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H (2002) Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends in Neurosciences* 25:313–319.
- Newcombe J, Uddin A, Dove R, Patel B, Turski L, Nishizawa Y, Smith T (2008) Glutamate receptor expression in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol.* 18:52–61.
- Nicaise C, Mitrecic D, Demetter P, Decker R de, Authelet M, Boom A, Pochet R (2009) Impaired blood-brain and blood-spinal cord barriers in mutant SOD1-linked ALS rat. *Brain Research* 1301:152–162.
- Olitsky PK, Yager RH (1949) Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *J. Exp. Med.* 90:213–224.
- Owens T, Bechmann I, Engelhardt B (2008) Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67:1113–1121.
- Palmer AM (2010) The blood-brain barrier. Special Issue: Blood Brain Barrier. *Neurobiology of Disease* 37:1–2.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6:1133–1141.
- Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4:617–629.
- Paul C, Bolton C (2002) Modulation of Blood-Brain Barrier Dysfunction and Neurological Deficits during Acute Experimental Allergic Encephalomyelitis by the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist Memantine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302:50–57.
- Paulsen CE, Carroll KS (2009) Orchestrating Redox Signaling Networks through Regulatory Cysteine Switches. *ACS chemical biology.*
- Pernis AB (2009) Th17 cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J. Intern. Med.* 265:644–652.
- Piani D, Frei K, Do KQ, Cuénod M, Fontana A (1991) Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neurosci. Lett.* 133:159–162.
- Pinteaux E, Parker LC, Rothwell NJ, Luheshi GN (2002) Expression of interleukin-1 receptors and their role in interleukin-1 actions in murine microglial cells. *J. Neurochem.* 83:754–763.
- Ponomarev ED, Dittel BN (2005) Gamma delta T cells regulate the extent and duration of inflammation in the

- central nervous system by a Fas ligand-dependent mechanism. *J. Immunol.* 174:4678–4687.
- Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Pedras-Vasconcelos J, Verthelyi D, Dittel BN (2007) GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 178:39–48.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CUA, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Research Reviews* 30:77–105.
- Redford EJ, Smith KJ, Gregson NA, Davies M, Hughes P, Gearing AJ, Miller K, Hughes RA (1997) A combined inhibitor of matrix metalloproteinase activity and tumour necrosis factor- α processing attenuates experimental autoimmune neuritis. *Brain* 120:1895–1905.
- Rio-Hortega Pd, Penfield W (1932) *Cytology and cellular pathology of the nervous system*. New York: Hoeber.
- Risau W, Engelhardt B, Wekerle H (1990) Immune function of the blood-brain barrier: incomplete presentation of protein (auto-)antigens by rat brain microvascular endothelium in vitro. *J. Cell Biol.* 110:1757–1766.
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933) Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.* 58:39–53.
- Robinson JM (2009) Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell Biol.* 131:465–469.
- Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P (1993) CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* 150:5445–5456.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Sava V, Catlow B, Lin X, Mori T, Cao C, Arendash GW (2009) Granulocyte colony stimulating factor decreases brain amyloid burden and reverses cognitive impairment in Alzheimer's mice. *Neuroscience* 163:55–72.
- Sandoval KE, Witt KA (2008) Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of Disease* 32:200–219.
- Schnittler HJ, Wilke A, Gress T, Suttrop N, Drenckhahn D (1990) Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *The Journal of Physiology* 431:379–401.
- Schreibelt G, Musters RJP, Reijerkerk A, Groot LR de, van der Pol SMA, Hendriks EML, Döpp ED, Dijkstra CD, Drukarch B, Vries HE de (2006) Lipoic acid affects cellular migration into the central nervous system and stabilizes blood-brain barrier integrity. *J. Immunol.* 177:2630–2637.
- Schreibelt G, van Horssen J, Haseloff RF, Reijerkerk A, van der Pol SMA, Nieuwenhuizen O, Krause E, Blasig IE, Dijkstra CD, Ronken E, Vries HE de (2008) Protective effects of peroxiredoxin-1 at the injured blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* 45:256–264.
- Scott DB, Blanpied TA, Swanson GT, Zhang C, Ehlers MD (2001) An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J. Neurosci.* 21:3063–3072.
- Sherman DL, Brophy PJ (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:683–690.
- Smith KJ, Felts PA, John GR (2000) Effects of 4-aminopyridine on demyelinated axons, synapses and muscle tension. *Brain* 123:171–184.
- Srinivasan R, Sailasuta N, Hurd R, Nelson S, Pelletier D (2005) Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain* 128:1016–1025.
- Stangel M, Compston A (2001) Polyclonal immunoglobulins (IVIg) modulate nitric oxide production and microglial functions in vitro via Fc receptors. *Journal of Neuroimmunology* 112:63–71.
- Stephenson FA (2006) Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 34:877–881.

- Stolzing A, Grune T (2004) Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. *FASEB J.*:03-0374fje.
- Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40:133–139.
- Stromnes IM, Goverman JM (2006) Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat. Protocols* 1:1952–1960.
- Suh H, Kim M, Lee SC (2005) Inhibition of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Signaling and Microglial Proliferation by Anti-CD45RO: Role of Hck Tyrosine Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt. *J Immunol* 174:2712–2719.
- Taylor DA, Stull JT (1988) Calcium dependence of myosin light chain phosphorylation in smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 263:14456–14462.
- Tham C, Lin F, Rao TS, Yu N, Webb M (2003) Microglial activation state and lysophospholipid acid receptor expression. *International Journal of Developmental Neuroscience* 21:431–443.
- Toft-Hansen H, Nuttall RK, Edwards DR, Owens T (2004) Key metalloproteinases are expressed by specific cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 173:5209–5218.
- Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L (2008) Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 172:146–155.
- Uyttenhove C, van Snick J (2006) Development of an anti-IL-17A auto-vaccine that prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 36:2868–2874.
- van Horssen J, Schreibelt G, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra CD, van der Valk P, Vries HE de (2008) Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic. Biol. Med.* 45:1729–1737.
- Verkhatsky A, Kirchhoff F (2007) NMDA Receptors in glia. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 13:28–37.
- Villoslada P, Arrondo G, Sepulcre J, Alegre M, Artieda J (2009) Memantine induces reversible neurologic impairment in patients with MS. *Neurology* 72:1630–1633.
- Weaver A, Goncalves da Silva A, Nuttall RK, Edwards DR, Shapiro SD, Rivest S, Yong VW (2005) An elevated matrix metalloproteinase (MMP) in an animal model of multiple sclerosis is protective by affecting Th1/Th2 polarization. *FASEB J.* 19:1668–1670.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE (2007) IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. *Annual Review of Immunology* 25:821–852.
- Weinstein JR, Hong S, Kulman JD, Bishop C, Kuniyoshi J, Andersen H, Ransom BR, Hanisch U, Möller T (2005) Unraveling thrombin's true microglia-activating potential: markedly disparate profiles of pharmaceutical-grade and commercial-grade thrombin preparations. *J. Neurochem.* 95:1177–1187.
- Wong H, Liu X, Matos MF, Chan SF, Pérez-Otaño I, Boysen M, Cui J, Nakanishi N, Trimmer JS, Jones EG, Lipton SA, Sucher NJ (2002) Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *J. Comp. Neurol.* 450:303–317.
- Wright JF, Bennett F, Li B, Brooks J, Luxenberg DP, Whitters MJ, Tomkinson KN, Fitz LJ, Wolfman NM, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K, Chatterjee-Kishore M, Carreno BM (2008) The Human IL-17F/IL-17A Heterodimeric Cytokine Signals through the IL-17RA/IL-17RC Receptor Complex. *J Immunol* 181:2799–2805.
- Xiong Z, Raouf R, Lu W, Wang L, Orser BA, Dudek EM, Browning MD, MacDonald JF (1998) Regulation of N-Methyl-d-Aspartate Receptor Function by Constitutively Active Protein Kinase C. *Molecular Pharmacology* 54:1055–1063.
- Yao Z, Spriggs MK, Derry JM, Strockbine L, Park LS, VandenBos T, Zappone JD, Painter SL, Armitage RJ (1997)

- Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine* 9:794–800.
- Yurchenco PD, Schittny JC (1990/4/1) Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4:1577–1590.
- Zajicek JP, Wing M, Scolding NJ, Compston DAS (1992) Interactions between oligodendrocytes and microglia: a major role for complement and tumor necrosis factor in oligodendrocyte adherence and killing. *Brain* 115:1611–1631.

Lebenslauf

Gegenwärtige Tätigkeit

Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. HJ Luhmann, Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universitätsmedizin Mainz in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ari Waisman, I.Med Klinik, Mainz.

Angaben zur Person

Name Jula Huppert
Adresse (dienstl.) Duesbergweg 6
55128 Mainz, Deutschland
Tel. (dienstl.) +49-6131-39-24549
Fax (dienstl.) +49-6131-39-26071
E-Mail huppert@uni-mainz.de
geboren 04.06.1982 in Göppingen
Nationalität Deutsch
Ausbildung
Dezember 2006 Abschluss Biologie (Diplom)
Oktober 2001 - Dezember 2006 Studium der Biologie,
Universität Karlsruhe (TH)
Juni 2001 Abitur
1992-2001 Gymnasium Balingen
1988-1992 Sichelschule Balingen

Publikation

Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., Bechmann, I., Becher, B., Luhmann, H.J., Waisman, A. & Kuhlmann, C.R.W. (2009) Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.*