

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der Einfluss von Interleukin-3 auf die Läsionslast der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Benjamin Saß

aus

Kiel

Göttingen 2017

Dekan:	Prof. Dr. H.K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. C. Stadelmann-Nessler
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Alexander Flügel
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Thomas Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 07.06.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der Einfluss von Interleukin-3 auf die Läsionslast der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie.....	2
1.1.3 Pathogenese.....	4
1.1.4 Histopathologie.....	6
1.1.5 Klinik und Verlauf.....	8
1.1.6 Diagnostik.....	9
1.1.7 Therapieprinzipien	10
1.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis.....	12
1.2.1 Historische Entwicklung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis	13
1.2.2 Aktuelle EAE-Modelle	13
1.2.3 Histopathologie und Immunopathologie der EAE.....	14
1.2.4 Kritik an der EAE	15
1.3 Interleukin-3	16
1.3.1 IL-3-Gen und Proteinstruktur.....	16
1.3.2 IL-3-Rezeptor.....	17
1.3.3 Funktionelle Bedeutung	19
1.3.4 Mögliche Rolle in Krankheitsprozessen	20
1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Extern durchgeführte Arbeiten.....	23
2.1.1 Versuchstiere.....	23
2.1.2 Verwendete Materialien und Chemikalien.....	23
2.1.3 EAE-Induktion und Behandlung der Mäuse.....	24
2.1.4 Verwendeter EAE-Score.....	25
2.2 Am Institut für Neuropathologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen durchgeführte Arbeiten.....	25
2.2.1 Zur Verfügung stehende Präparate	25
2.2.2 Durchführung der Färbungen	26
2.2.3 Auswertung.....	31

3	Ergebnisse	35
3.1	Einfluss von Interleukin-3 auf die EAE.....	35
3.1.1	Symptomatik und Verlauf.....	35
3.1.2	Vergleich der Läsionslast.....	37
3.1.3	T-Zell-Infiltration.....	40
3.2	Einfluss einer anti-IL3-Antikörper-Therapie auf die EAE.....	43
3.2.1	Symptomatik und Verlauf.....	44
3.2.2	Vergleich der Läsionslast.....	48
3.2.3	T-Zell-Infiltration.....	52
4	Diskussion	56
4.1	Wandel im Verständnis der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis.....	56
4.2	Die Bedeutung von Interleukin-3 im ZNS.....	58
4.3	Interleukin-3 kann die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis verstärken.....	59
4.4	Der Einfluss des anti-IL-3-Antikörpers auf die EAE-Induktion erfordert weitere Untersuchungen.....	62
4.5	Schlussfolgerung.....	65
4.6	Ausblick.....	66
5	Zusammenfassung	68
6	Literaturverzeichnis	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Struktur des IL-3-Rezeptors.....	19
Abbildung 2.1:	Ausrichtung der Präparate im Paraffinblock.....	26
Abbildung 2.2:	Indirekte Immunmarkierung mit enzymgekoppeltem Avidin.....	28
Abbildung 2.3:	Übersichtsaufnahme in der LFB/PAS-Färbung und Ausschnittsvergrößerung.....	32
Abbildung 2.4:	CD3-positive Zellen in der Übersichtsaufnahme und Ausschnittsvergrößerung.....	32
Abbildung 2.5:	CD3-positive Zellen in der Detailaufnahme.....	33
Abbildung 3.1:	Beginn der EAE-Manifestation im IL-3-Versuch.....	36
Abbildung 3.2:	Klinische Verläufe im IL-3-Versuch.....	37
Abbildung 3.3:	Vergleich der kumulativen EAE-Scores im IL-3-Versuch.....	37
Abbildung 3.4:	Einfluss von Interleukin-3 auf die Läsionslast.....	39
Abbildung 3.5:	Kumulativer EAE-Score und Läsionslast im IL-3-Versuch.....	40
Abbildung 3.6:	T-Zell-Infiltration unter IL-3-Therapie.....	41
Abbildung 3.7:	Läsionslast und T-Zell-Infiltration im IL-3-Versuch.....	42
Abbildung 3.8:	T-Zell-Infiltration und kumulativer Score im IL-3-Versuch.....	43
Abbildung 3.9:	Symptomfreie Tage vor EAE-Manifestation im anti-IL-3-Versuch: a) mit allen Tieren und b) ohne Tiere mit nicht gelungener EAE-Induktion.....	44
Abbildung 3.10:	Symptomfreie Tage vor EAE-Manifestation im anti-IL-3 (deglykosyliert)- Versuch.....	45
Abbildung 3.11:	EAE-Verlauf der anti-IL-3- und Kontrollgruppen.....	46
Abbildung 3.12:	Vergleich der kumulativen EAE-Scores im anti-IL-3-Versuch.....	47
Abbildung 3.13:	Vergleich der kumulativen Scores im anti-IL-3 (deglykosyliert)- Wiederholungsversuch.....	48
Abbildung 3.14:	Läsionslast im anti-IL-3-Versuch.....	50
Abbildung 3.15:	Läsionslast im 11-tägigen anti-IL-3-Versuch.....	51
Abbildung 3.16:	Kumulativer EAE-Score und Läsionslast im anti-IL-3-Versuch.....	52
Abbildung 3.17:	T-Zell-Infiltration im anti-IL-3-Versuch.....	53
Abbildung 3.18:	Läsionslast und T-Zell-Infiltration im anti-IL-3-Versuch.....	54
Abbildung 3.19:	T-Zell-Infiltration und kumulative Scores im anti-IL-3-Versuch.....	55
Abbildung 4.1:	T-Helferzell-Subpopulationen.....	58
Abbildung 4.2:	Mögliche IL-3-Effekte auf die EAE.....	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	McDonald-Kriterien 2010.....	10
Tabelle 1.2:	Stufentherapie der multiplen Sklerose.....	11
Tabelle 2.1:	In externen Versuchen verwendete Antikörper.....	23
Tabelle 2.2:	In externen Versuchen verwendete Zytokine, Adjuvantien und weitere Materialien.....	24
Tabelle 2.3:	Überblick über die verschiedenen Behandlungsprotokolle	25
Tabelle 2.4:	EAE-Score.....	25
Tabelle 2.5:	Verwendete Chemikalien und Substanzen	30
Tabelle 2.6:	Verwendete Antikörper	31
Tabelle 2.7:	Verwendete Geräte und Software.....	34
Tabelle 3.1:	EAE-Inzidenz in der IL-3- und Kontrollgruppe.....	38
Tabelle 3.2:	EAE-Inzidenz in anti-IL-3- und Kontrollgruppen.....	48

Abkürzungsverzeichnis

20 α SDH	20- α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
AT-EAE	Adoptiv-Transfer-EAE
AUC	<i>area under the curve</i> (Fläche unterhalb der Verlaufskurve)
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungscluster)
CI	Konfidenzintervall
CIS	<i>clinically isolated syndrome</i> (klinisch isoliertes Syndrom)
DAB	3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
FCS	fetales Kälberserum
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hIL-3	humanes IL-3
hIL-3R	humaner IL-3-Rezeptor
hIL-3R α	α -Untereinheit des humanen IL-3-Rezeptors
hIL-3R β c	β c-Untereinheit des humanen IL-3-Rezeptors
i. p.	intraperitoneal
IFN- β	β -Interferon
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IVIg	intravenöse Immunglobuline
JAK2	Januskinase 2
LFB/PAS	Luxol-Fast-Blue/Perjodsäure-Schiff-Reagenz
MBP	<i>myelin basic protein</i> (basisches Myelinprotein)
mIL-3	murines IL-3
mIL-3R α	α -Untereinheit des murinen IL-3-Rezeptors
mIL-3R β c	β c-Untereinheit des murinen IL-3-Rezeptors
mIL-3R β _{IL-3}	IL-3-spezifische murine β -Untereinheit des IL-3-Rezeptors
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MOG ₃₅₋₅₅	MOG-Peptid 35-55
MS	multiple Sklerose
multi-CSF	<i>multi colony-stimulating factor</i> (multipotenter Kolonie-stimulierender Faktor)
MW	Mittelwert
NAWM	<i>normal-appearing white matter</i> (normal erscheinende weiße Substanz)
p	Signifikanzwert

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PLP	Proteolipidprotein
PPMS	<i>primary-progressive multiple sclerosis</i> (primär progrediente multiple Sklerose)
PRMS	<i>progressive-relapsing multiple sclerosis</i> (primär progrediente multiple Sklerose mit Schüben)
RRMS	<i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i> (schubförmige multiple Sklerose)
r_s	Spearman-Korrelationskoeffizient
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-beta</i>
TIFF	<i>tagged image file format</i>
TZ	T-Zelle, T-Lymphozyt
ZNS	zentrales Nervensystem
Δ MW	Differenz der Mittelwerte

1 Einleitung

Die multiple Sklerose (MS) ist eine demyelinisierende, entzündliche Krankheit des zentralen Nervensystems, die bei den Betroffenen schwere neurologische Ausfälle und Behinderungen verursachen kann (Lassmann et al. 2001). Als etabliertes Tiermodell gilt die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), eine künstlich induzierte neuroinflammatorische Erkrankung, die zahlreiche Ähnlichkeiten mit der MS aufweist, allerdings nicht mit ihr gleichzusetzen ist (Constantinescu et al. 2011). Dem hämatopoetischen Wachstumsfaktor Interleukin-3 (IL-3) wird eine bedeutende Rolle bei inflammatorischen Prozessen zugesprochen (Hercus et al. 2013). Das Zytokin ist eng verwandt mit dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), der nach aktuellem Kenntnisstand wesentlich für die Ausbildung einer EAE ist, sodass auch eine pathogenetische Bedeutung für die MS angenommen werden kann (Rasouli et al. 2015). Bislang unklar ist, inwieweit auch Interleukin-3 an der Entstehung neuroinflammatorischer Erkrankungen beteiligt ist.

1.1 Multiple Sklerose

Die auch als Encephalomyelitis disseminata bezeichnete Erkrankung gilt als die häufigste neurologische Erkrankung junger Erwachsener der entwickelten Welt und verursacht alleine in Europa jährlich direkte und indirekte Kosten von nahezu 15 Milliarden Euro (Lassmann et al. 2001, Sobocki et al. 2007, Gustavsson et al. 2011).

Obwohl Ätiologie und Pathogenese bis heute nicht vollständig geklärt sind, wird angenommen, dass der Erkrankung Autoimmunprozesse, die nach einer Sensibilisierung gegen Bestandteile des zentralen Nervensystems (ZNS) durch weitestgehend unbekannte Faktoren auftreten, zugrunde liegen (Noseworthy 1999, Keegan und Noseworthy 2002). Neben dieser Autoimmunhypothese werden aber weitere, gänzlich verschiedene Krankheitskonzepte diskutiert und insbesondere der neurodegenerativen Komponente der Erkrankung große Bedeutung beigemessen (Chaudhuri 2013, Behan und Chaudhuri 2010).

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit sind etwa 2,3 Millionen Menschen an MS erkrankt, davon annähernd zwei Drittel Frauen (Multiple Sclerosis International Federation 2013). Inzidenz und Prävalenz unterliegen ausgeprägten lokalen Unterschieden. Während in West-Europa und Nordamerika die höchsten Prävalenzen vorliegen, scheint die Erkrankung in Asien, Afrika und dem Mittleren Osten am seltensten aufzutreten (Koch-Henriksen und Sørensen 2010). In Europa leben etwa 540.000 Menschen mit MS, davon 105.000 in Deutschland (Gustavsson et al. 2011). Die europaweite Prävalenz wird mit 79/100.000 angegeben, die

Inzidenz mit 4,2/100.00/Jahr, aber auch innerhalb Europas zeigen sich regional z.T. erheblich abweichende Erkrankungshäufigkeiten (Kobelt und Pugliatti 2005, Fasbender et al. 2008). Die oft beschriebene Zunahme von Prävalenz und Inzidenz der Erkrankung in höheren geografischen Breiten wird heute kontrovers diskutiert (Koch-Henriksen und Sørensen 2010, Koch-Henriksen und Sorensen 2011, Grant und Mascitelli 2012, Evans et al. 2013).

Das Erkrankungsrisiko wird auch durch die Ethnie beeinflusst. So findet sich unter norwegischen Samen gegenüber der übrigen Bevölkerung eine deutlich erniedrigte MS-Prävalenz (Harbo et al. 2007). In den USA wurde lange Zeit ein erniedrigtes Erkrankungsrisiko für Afroamerikaner gegenüber europäisch-stämmigen Amerikanern angenommen. Im Widerspruch dazu zeigte sich allerdings in einer aktuellen kalifornischen Studie unter Afroamerikanern die höchste MS-Inzidenz, während Hispanoamerikaner und Asiaten am seltensten betroffen waren (Langer-Gould et al. 2013).

1.1.2 Ätiologie

Während die durch multiple Sklerose verursachten histopathologischen Veränderungen immer genauer beschrieben werden, bleiben deren Auslöser weiterhin unklar. So ist die ätiologische Bedeutung genetischer Faktoren, bakterieller und viraler Infektionen, eines Vitamin-D-Mangels und weiterer Umwelteinflüsse umstritten.

1.1.2.1 Genetik

Das familiär gehäufte Auftreten der Erkrankung lässt eine genetische Disposition vermuten. Allerdings erkranken nur etwa 30% der eineiigen Zwillinge MS-Erkrankter ebenfalls (Spielman und Nathanson 1982). Ein besonderer Einfluss auf die MS-Suszeptibilität wird den Genen des humanen Leukozytenantigen-Systems zugesprochen (Link et al. 2012). Außerhalb dieser Genregionen sind bis heute weitere mehr als 100 Gene, die das MS-Risiko beeinflussen, bekannt (Beecham et al. 2013). Insgesamt ist von einer polygenetischen Beeinflussung der MS-Suszeptibilität auszugehen, die im Zusammenspiel mit einer Exposition gegenüber bestimmten Umweltfaktoren während der Adoleszenz für den Krankheitsausbruch oder -progress von Bedeutung ist (The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium [IMSGC] 2010, Giovannoni et al. 2006, Kurtzke 2013).

1.1.2.2 Infektionen – Bedeutung als auslösende Umweltfaktoren

Als ätiologisch bedeutsame Umweltfaktoren werden zahlreiche, besonders virale Infektionen gehandelt (Gilden 2005, Giovannoni et al. 2006). Einige dieser Krankheitserreger können auch noch nach Jahren reaktiviert werden und immunologische Prozesse, die zu einer Demyelinisierung führen, auslösen. Als Indiz für eine infektiöse Genese können die bei mehr als 90% der MS-Patienten als oligoklonale Banden im Liquor cerebrospinalis nachgewiesenen Immunglobuline gewertet werden, die sonst vor allem bei

entzündlichen Infektionskrankheiten des ZNS auftreten (Gilden 2005). Sogar eine sexuelle Übertragbarkeit der Erkrankung wurde kurz und heftig diskutiert, ohne dass sich hierfür letztlich belastbare Hinweise finden ließen (Hawkes 2002, O'Donovan 2003, Stewart 2002, Lidegaard und Svendsen 2008).

Zahlreiche Viren, wie das Epstein-Barr-Virus, das humane Herpesvirus 6, das Torque-Teno-Virus, aber auch Retroviren, werden z.T. seit Jahrzehnten im Zusammenhang mit MS untersucht (Ascherio und Munch 2000, Cermelli et al. 2003, Mancuso et al. 2013, Koprowski et al. 1985, Greenberg et al. 1989, Perron et al. 1989, Perron et al. 1991, Rozenberg et al. 1991, Hackett et al. 1996, Rasmussen et al. 1997). Dennoch konnte bis heute kein Virus als MS-Auslöser sicher identifiziert werden. Neben Viren wird auch das vor allem als Erreger von Atemwegserkrankungen bekannte, aber mit sehr unterschiedlichen chronischen Erkrankungen in Verbindung gebrachte, obligat intrazelluläre Bakterium *Chlamydia pneumoniae* als mögliches MS-Pathogen diskutiert (Roulis et al. 2013, Sriram et al. 1998, Sriram et al. 1999, Yao et al. 2001, Sotgiu et al. 2001, Derfuss et al. 2001).

1.1.2.3 Infektionen – die Hygienehypothese

Nach der sogenannten Hygienehypothese ist die steigende Zahl chronisch-entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen Ausdruck einer Fehlfunktion der Immunregulation, die auf verbesserte Hygienestandards und die damit verbundene Depletion von Organismen, mit denen sich das menschliche Immunsystem koevolutionär entwickelte, zurückzuführen ist (Rook 2012). So ist die MS-Prävalenz in Regionen mit besserem Hygienestandard erhöht; eine frühzeitige Exposition von Kindern gegenüber Krankheitserregern durch Geschwisterkinder im Kleinkindalter, frühzeitigem Besuch einer Kindertagesstätte und Leben in Städten senkt jedoch das Risiko – zumindest in Ländern mit hohem Hygienestandard (Leibowitz et al. 1966, Conradi et al. 2011, Ponsonby 2005, Hughes et al. 2013, Stefano et al. 2003).

1.1.2.4 Weitere Umweltfaktoren

Seit Jahrzehnten werden eine verminderte Sonnenlichtexposition und Vitamin-D-Mangel als potenzielle Risiken angesehen (Sutherland et al. 1962, Goldberg et al. 1986, Duan et al. 2014). Unklar ist, ob es sich tatsächlich um unabhängige Faktoren handelt oder der Einfluss einer verminderten Sonnenlichtexposition letztlich nur durch konsekutiv erniedrigte Vitamin-D-Spiegel vermittelt wird (Lucas et al. 2011, Ascherio et al. 2011, Hart et al. 2011, Lemire und Archer 1991, Becklund et al. 2010).

Zigarettenrauchen ist – durch immunmodulatorische oder direkt neurotoxische Effekte – mit einem deutlich erhöhten MS-Risiko assoziiert (Riise et al. 2003, Hernán et al. 2001, Hedström et al. 2013, Handel et al. 2011b, Salzer et al. 2013, O’Gorman et al. 2012). Auch

Alkoholkonsum wird als unabhängiger Risikofaktor diskutiert (Hawkes 2005, Massa et al. 2013, Hedström et al. 2014).

1.1.2.5 Chronische zerebrospinale venöse Insuffizienz

Einige Jahre wurde eine eisenabhängige Inflammation aufgrund einer durch extrakranielle venöse Strikturen bedingten chronischen zerebrospinalen venösen Insuffizienz als Ursache der MS diskutiert (Zamboni 2006, Zamboni et al. 2008, Singh und Zamboni 2009). Trotz intensiver Forschung konnte in zahlreichen Studien dieses Konzept insgesamt nicht bestätigt werden, sodass es heute von den meisten – aber nicht allen – Autoren abgelehnt wird (Barreto et al. 2013, Brod et al. 2013, Comi et al. 2013, Tsvigoulis et al. 2014, Rasminsky und terBrugge 2013, Ghezzi 2013, Hutchinson 2013, Zivadinov und Weinstock-Guttman 2013).

1.1.3 Pathogenese

Wie in Kapitel 1.1.4 beschrieben wird, sind Neuroinflammation und -degeneration zentrale Merkmale der Erkrankung. Die gängige Autoimmunhypothese wird teils kontrovers diskutiert und von einigen Autoren eine primäre Neurodegeneration mit nur sekundärem entzündlichen Geschehen vermutet (Lassmann 2010, Trapp und Nave 2008, Stys et al. 2012, Chaudhuri 2013).

1.1.3.1 Autoimmunhypothese

Grundlegende Annahme der Autoimmunhypothese ist, dass durch autoreaktive, für das *cluster of differentiation 4* (CD4) positive Lymphozyten eine Entzündung des ZNS ausgelöst wird, in deren Folge es zu neurodegenerativen Prozessen kommt (Nakahara et al. 2012). Dabei wurden im klassischen Modell zunächst T_H1 -Zellen proinflammatorische und T_H2 -Zellen protektive Eigenschaften zugeschrieben. Weitere Untersuchungen brachten die wesentlich später entdeckten T_H17 -Zellen in den Fokus (Tzartos et al. 2008). Nach heutigem Erkenntnisstand sind sowohl T_H1 - als auch T_H17 -Zellen in der Lage, Axonopathien und Demyelinisierung zu verursachen. Bei MS-Patienten lassen sich für beide Subpopulationen typische Immunantworten nachweisen (Carbajal et al. 2015). Das Vorkommen autoreaktiver, gegen ZNS-Bestandteile gerichteter Zellen ist per se allerdings nicht pathologisch, sondern lässt sich auch bei Gesunden, wenn auch nur mit niedriger Avidität und weniger proinflammatorischem Phänotyp, zeigen (Pette et al. 1990, Hohlfeld und Wekerle 2004, Bielekova et al. 2004). Sogar neuroprotektive Effekte solcher autoreaktiver Lymphozyten und der von ihnen verursachten inflammatorischen Reaktionen wurden beschrieben (Moalem et al. 1999, Hohlfeld und Wekerle 2004, Kerschensteiner et al. 2003).

Die Entzündung verläuft in zwei Wellen: In der ersten Phase der Läsionsbildung finden sich nur wenige T-Lymphozyten. Oligodendrozytenschädigung und Demyelinisierung

werden von einer massiven Aktivierung phagozytärer Zellen begleitet. Erst später kommt es zu einem ausgeprägten Einstrom weiterer T-, aber auch B-Lymphozyten (Lassmann 2011, Lassmann und van Horssen 2011). Unter den T-Zellen dominieren in den MS-Läsionen klonal expandierte CD8⁺-Zellen (Babbe et al. 2000).

Tierversuche lassen vermuten, dass dendritische Zellen, die aus dem zentralen Nervensystem antigenbeladen in die tiefen zervikalen Lymphknoten migrieren und dort Autoantigene (oder kreuzreaktive Epitope) präsentieren, antigenspezifische T-Lymphozyten aktivieren und so den Übertritt der enzephalitogenen Zellen in das ZNS ermöglichen (Karman et al. 2004, Furtado et al. 2008). Diese Zellen könnten dann durch Aktivierung des sonst nicht – oder nur geringfügig – für Leukozyten durchgängigen Blut-Hirn-Schranken-Endothels den Einstrom unspezifischer Zellen bahnen (Steinman 1996, Reboldi et al. 2009).

Der Nachweis von B-Lymphozyten in Läsionen der weißen und grauen Substanz sowie in follikelartigen Strukturen in den Meningen (s.a. Kapitel 1.1.4), aber ebenso Ablagerungen von Immunglobulinen in MS-Plaques lassen eine wichtige Rolle auch dieser Zellen in der Pathogenese vermuten (Lucchinetti et al. 2011, Frischer et al. 2009, Serafini et al. 2004, Lucchinetti et al. 2000). Darauf deutet zudem der therapeutische Erfolg von Rituximab hin, einem monoklonalen Antikörper, der zur Depletion der CD20-positiven B-Lymphozyten führt (Hauser et al. 2008). Als weiteres Indiz kann der Nachweis von klonal expandierten B-Lymphozyten und Plasmazellen sowie den von ihnen produzierten oligoklonalen Immunglobulinen im Liquor cerebrospinalis bei nahezu allen MS-Patienten angeführt werden (Walsh et al. 1985, Obermeier et al. 2008, Büdingen et al. 2010). Allerdings bestehen widersprüchliche Ansichten bezüglich der Reaktivität solcher Antikörper gegenüber Myelinbestandteilen (Markovic et al. 2003, Owens et al. 2009, Büdingen et al. 2008).

1.1.3.2 Neurodegenerative Hypothese

Neben der genannten Autoimmunhypothese wird eine primäre Neurodegeneration mit erst sekundärer Entzündungsreaktion von einigen Autoren diskutiert (Lassmann 2010, Trapp und Nave 2008, Stys et al. 2012). Als Hinweis auf eine entzündungsunabhängige neurodegenerative Komponente der MS kann das schlechte Ansprechen auf eine immunmodulierende Therapie im chronisch-progressiven Verlauf gedeutet werden (Bates 2011, Leary und Thompson 2005, Wiendl und Hohlfeld 2009). Auch der in frühen, sogenannten Typ III-Läsionen und am Rand aktiv demyelinisierender Läsionen beschriebene rasche Untergang von Oligodendrozyten (vgl. Kapitel 1.1.4.1) sowie die elektronenmikroskopisch beobachtete primäre Schädigung innerer Myelinlamellen in MS-Plaques werden durch die Autoimmunhypothese unzureichend erklärt (Lucchinetti et al. 2000, Barnett und Prineas 2004, Henderson et al. 2009, Rodriguez und Scheithauer 1994). Zwei Studien mit Tiermodellen, in deren Rahmen durch eine künstlich hervorgerufene

Oligodendrozytendegeneration versucht wurde, eine sekundäre Inflammation hervorzurufen, lieferten widersprüchliche Ergebnisse (Locatelli et al. 2012), (Traka et al. 2016).

Letztlich beschreiben beide Hypothesen einen komplexen Zusammenhang zwischen Neurodegeneration und Inflammation, ohne dass bis heute das primäre Ereignis sicher identifiziert werden konnte (Lassmann 2010).

1.1.4 Histopathologie

Die erste neuropathologische Beschreibung disseminierter Plaques geht auf Robert Carswell (1838) zurück, einen Zusammenhang zwischen „Hirnsklerose“ und neurologischen Ausfällen erkannte aber erst Friedrich von Frerich 1849. Schließlich beschrieb Jean-Martin Charcot 1868 ausführlich die *Sclérose en Plaques* und veröffentlichte detaillierte makroskopische und mikroskopische Illustrationen dazu (Murray 2009).

Die multiple Sklerose bietet histologisch ein sehr heterogenes Bild (Lucchinetti et al. 2000). Neben den MS-typischen Plaques rücken heute Veränderungen im Bereich der nicht sklerosierten weißen Substanz, der grauen Substanz und globale Schäden an Gehirn und Rückenmark, wie eine generalisierte Atrophie, in den Fokus (Stadelmann et al. 2011, Miller et al. 2002, Lassmann et al. 2007).

1.1.4.1 Läsionen der weißen Substanz

In den entzündlichen Infiltraten der demyelinisierten Läsionen prädominieren unter den T-Lymphozyten zwar die CD8⁺-Zellen, aber auch B-Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Mikroglia lassen sich in den Plaques nachweisen (Babbe et al. 2000, Frischer et al. 2009). Die **aktiv demyelinisierenden Läsionen** lassen sich nach Lucchinetti et al. (2000), basierend auf Plaquegröße und -lokalisierung, Myelin- und Oligodendrozytenschädigung sowie Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplement, in vier verschiedene Typen einteilen:

- Läsionstyp I: Die scharf begrenzten Läsionen sind um kleine Venen und Venolen zentriert. Eine durch T-Lymphozyten und Makrophagen vermittelte Entzündung dominiert. Aktive Läsionen zeigen im Randbereich einen Verlust der Oligodendrozyten, in inaktiven Zentren treten diese wieder vermehrt auf. Wie auch bei Läsionstyp II lassen sich dünn myelinisierte Markschattenherde nachweisen.
- Läsionstyp II: Der häufigste Läsionstyp entspricht im wesentlichen Typ I, zeigt aber typischerweise zusätzlich eine ausgeprägte Ablagerung von Immunglobulinen (v.a. IgG) und Komplementfaktoren.
- Läsionstyp III: Diese unscharf begrenzten Plaques sind nicht um kleine Gefäße zentriert. Gefäße innerhalb der Läsionen haben einen gut myelinisierter Saum. Infiltrate bestehen ebenfalls hauptsächlich aus T-Lymphozyten, Makrophagen und aktivierter

Mikroglia, aber ohne Immunglobulin- oder Komplementablagerungen. Im aktiven Randbereich ist ein ausgeprägter Oligodendrozytenverlust zu beobachten, im inaktiven Zentrum finden sich fast keine Oligodendrozyten. Markschatenherde fehlen.

- Läsionstyp IV: Wieder finden sich vor allem T-Lymphozyten und Makrophagen in den Infiltraten, ohne Ablagerung von Immunglobulinen und Komplement. Oligodendrozytendegeneration tritt vor allem in einem schmalen Rand um den scharf begrenzten Plaque auf. In aktiven und inaktiven Läsionen zeigen sich nahezu keine Oligodendrozyten mehr. Remyelinisierung findet hier nicht statt.

Somit ähneln Typ I und II einer T-Zell-vermittelten bzw. einer T-Zell- und Antikörper-vermittelten autoimmunen Enzephalomyelitis. Läsionstyp III und IV fallen durch eine frühe Oligodendrozytendystrophie, ähnlich einer Virus- oder Toxin-induzierten Demyelinisierung, auf. Läsionen vom Typ III sind zudem mit einem kurzen Krankheitsverlauf assoziiert. In der Arbeit von Lucchinetti et al. zeigte sich eine interindividuelle Heterogenität, ohne dass unterschiedliche Läsionstypen bei ein und demselben Patienten auftraten (Lucchinetti et al. 2000). Barnett und Prineas beobachteten jedoch durchaus eine intraindividuelle Heterogenität und interpretieren die verschiedenen Plaquetypen als unterschiedliche Stadien der Läsionsbildung; Typ-III-ähnliche Läsionen wurden dabei als Frühstadium gewertet (Barnett und Prineas 2004, Barnett et al. 2009). Nach langjährigem Krankheitsverlauf beobachteten Breij et al. (2008) nur noch einen gemeinsamen, homogenen Demyelinisierungsmechanismus im Sinne einer durch Immunglobuline und Komplementfaktoren induzierten Phagozytose.

Die weitaus häufiger in Autopsien nachgewiesenen demyelinisierten **chronischen Läsionen** sind hypozellulär, allenfalls randständig remyelinisiert und zeigen eine astrozytäre Gliose. Ursächlich für die ausbleibende Remyelinisierung könnten die nur spärlich vorhandenen entzündlichen Infiltrate und der folgende Mangel proinflammatorischer Zytokine sein, die ein für eine Remyelinisierung günstiges Umfeld schaffen können. Diese veränderte Immunantwort mag auch für einen Differenzierungsblock oligodendrogialer Progenitorzellen verantwortlich sein (Kuhlmann et al. 2008). Insgesamt lassen sich mit zunehmendem Läsionsalter aber immer weniger Oligodendrozytenvorläufer in den Plaques nachweisen, wozu möglicherweise spezifische Antikörper gegen diese Zellen beitragen (Wolswijk 2002, Niehaus et al. 2000). Einige chronische Läsionen zeigen sich durch Demyelinisierung der angrenzenden weißen Substanz langsam größenprogredient (Prineas et al. 2001). Obwohl klassischerweise für die MS eine Demyelinisierung mit relativem Erhalt der Axone beschrieben wird, lässt sich in den chronischen Läsionen ein deutlicher Axonverlust nachweisen (Storch und Lassmann 1997, Lovas et al. 2000, Frischer et al. 2009).

Als Ausdruck **globaler Veränderungen der weißen Substanz** treten, akzentuiert um Läsionen, im chronisch-progredienten Stadium Demyelinisierung und axonale Schäden im Bereich der normal erscheinenden weißen Substanz (*normal-appearing white matter, NAWM*)

auf, womöglich durch eine globale Akkumulation von Entzündungszellen hinter wieder intakter Blut-Hirn-Schranke verursacht (Kutzelnigg et al. 2005).

1.1.4.2 Schäden der grauen Substanz

Die Beteiligung der grauen Substanz wurde schon früh erkannt und gilt heute als typisches Merkmal sowohl der primär als auch der sekundär chronisch progredienten MS (Brownell und Hughes 1962, Kutzelnigg et al. 2005, Albert et al. 2007). Vier Läsionstypen können nach ihrer Lokalisation innerhalb des Kortex unterschieden werden:

- Läsionen vom Typ I finden sich im Übergangsbereich zwischen weißer und grauer Substanz (leukokortikale Läsionen).
- Läsionen vom Typ II sind mitten im Kortex lokalisiert, erreichen aber weder dessen Oberfläche noch die weiße Substanz (intrakortikale Läsionen).
- Die am häufigsten vorkommenden Läsionen vom Typ III sind subpial gelegen und können bis tief in den Kortex reichen. Sie können sich über mehrere Gyri ausbreiten (subpiale Läsionen).
- Läsionen vom Typ IV erfassen alle Kortexschichten ohne die weiße Substanz (Bø et al. 2003b).

Neben den kortikalen Läsionen sind im Rahmen der MS vor allem Rückenmark und Kleinhirn betroffen, aber auch Hippocampus, Thalamus und anderer Bereiche tiefer grauer Substanz (Gilmore et al. 2009, Kutzelnigg et al. 2007, Geurts et al. 2007, Papadopoulos et al. 2009, Klaver et al. 2013).

Läsionen der grauen Substanz bei etablierter MS enthalten vergleichsweise weniger entzündlich Infiltrate, auch Komplementablagerungen sind rar (Peterson et al. 2001, Bø et al. 2003a, Brink et al. 2005). Weitere typische Merkmale sind Axon- und Dendritenschädigungen, neuronale Apoptosen sowie eine hohe Remyelinisierungskapazität (Peterson et al. 2001, Albert et al. 2007). Bei Patienten mit sekundär progredienter MS wurden z.T. große Immunezellansammlungen in den Leptomeningen entdeckt, die strukturell an ektope sekundäre Lymphfollikeln erinnern und vermutlich zu pathologischen Prozessen der grauen Substanz beitragen (Serafini et al. 2004, Howell et al. 2011, Magliozzi et al. 2006). Demyelinisierte kortikale Läsionen von entzündlichem Charakter lassen sich bereits früh im Krankheitsverlauf sowohl bildgebend als auch histopathologisch nachweisen (Calabrese und Gallo 2009, Lucchinetti et al. 2011, Popescu et al. 2011).

1.1.5 Klinik und Verlauf

Die verschiedenen Verlaufsformen der multiplen Sklerose lassen sich aus dem Zusammenspiel der beiden grundlegend unterschiedlichen Prozesse, akuter Schub und chronisches Fortschreiten der Behinderung, ableiten (Brück 2005). Die räumliche und

zeitliche Dissemination der Erkrankung spiegelt sich in einem sehr variablen klinischen Bild wider (Bitsch und Brück 2002).

Am häufigsten wird zunächst eine **schubförmige multiple Sklerose** (*relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS*) diagnostiziert, die in 25 – 40% in eine **sekundär progrediente multiple Sklerose** (*secondary-progressive multiple sclerosis, SPMS*) übergeht. Diese lässt sich diagnostizieren, wenn es für mindestens sechs Monate unabhängig von einem Schub zur klinischen Verschlechterung kommt (Katz Sand und Lublin 2013).

In nur 10 – 15% manifestiert sich die multiple Sklerose in der **primär progredienten Verlaufsform** (*primary-progressive multiple sclerosis, PPMS*). Das Durchschnittsalter bei Krankheitsbeginn ist mit 40 Jahren etwa 10 Jahre höher als bei der RRMS (Miller und Leary 2007). Der Begriff der **primär progredienten multiplen Sklerose mit Schüben** (*progressive-relapsing multiple sclerosis, PRMS*) trägt einer von Krankheitsbeginn an fortschreitenden neurologischen Verschlechterung mit Schüben und Remissionsphasen Rechnung (Lublin und Reingold 1996). Die Symptomatik und Gesamtprognose ähnelt der PPMS, sodass diese Unterscheidung umstritten ist (Kremenchutzky et al. 1999, Tullman et al. 2004).

Als **klinisch isoliertes Syndrom** (*clinically isolated syndrome, CIS*) wird die erstmalige, für mehr als 24 Stunden symptomatische, mono- oder multifokale entzündliche ZNS-Manifestation ohne bisherige zeitliche Dissemination beschrieben (Marcus und Waubant 2013). Mit einem **radiologisch isolierten Syndrom** (*radiologically isolated syndrome*) wird der Nachweis MS-typischer Befunde im MRT ohne klinisches Korrelat beschrieben (Miller et al. 2012).

1.1.6 Diagnostik

Das klinische Bild ist wegweisend für die Diagnosestellung, dabei sind die auftretenden Symptome aber meist nicht krankheitsspezifisch (Keegan und Noseworthy 2002, Compston und Coles 2008). So beschreibt die Charcot-Trias aus Nystagmus, Intentionstremor und skandierender Sprache eher allgemein eine zerebelläre Symptomatik (Gafson et al. 2012, Kumar et al. 2011). Als charakteristisch werden dennoch das Lhermitte-Zeichen (ein elektrisierendes Gefühl in Rumpf und Extremitäten bei Flexion des Kopfes) oder das Uhthoff-Phänomen (eine vorübergehende Verschlechterung der Symptomatik bei Anstieg der Körpertemperatur) beschrieben (Compston und Coles 2008). Die Kernspintomographie gewinnt heute zunehmend an Bedeutung und kann andere Kriterien ergänzen oder sogar ersetzen. Dies spiegelt sich auch in den 2001 vom *International Panel on Diagnosis of Multiple Sclerosis* vorgeschlagenen und mittlerweile in zweiter Überarbeitung gebräuchlichen McDonald-Kriterien wider, vgl. Tabelle 1.1 (McDonald et al. 2001, Polman et al. 2011, Katz Sand und Lublin 2013).

Tabelle 1.1: McDonald-Kriterien 2010

Klinische Präsentation	Zusätzlich benötigte Diagnostik
<p>≥ 2 Schübe und entweder objektive klinische Evidenz für ≥ 2 Läsionen oder objektive Evidenz für 1 Läsion mit weiterem Schub in der Anamnese</p>	keine
<p>≥ 2 Schübe und objektive klinische Evidenz für 1 Läsion</p>	<p>Nachweis einer räumlichen Dissemination durch</p> <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 1 T2-Läsion in mindestens 2 von 4 typischen Lokalisationen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell oder im Rückenmark) oder • Abwarten eines weiteren Schubes in einer anderen Lokalisation
<p>1 Schub und objektive klinische Evidenz für ≥ 2 Läsionen</p>	<p>Nachweis einer zeitlichen Dissemination durch</p> <ul style="list-style-type: none"> • gleichzeitigen Nachweis von asymptomatischen Gadolinium-aufnehmenden und nicht aufnehmenden Läsionen im MRT oder • Nachweis einer neuen T2- und/oder Gadolinium-aufnehmenden Läsion im Verlaufs-MRT oder • Abwarten eines weiteren Schubes
<p>1 Schub und objektive klinische Evidenz für 1 Läsion (CIS)</p>	<p>Nachweis der räumlichen Dissemination durch</p> <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 1 T2-Läsion in mindestens 2 von 4 typischen Lokalisationen oder • Abwarten eines weiteren Schubes in einer anderen Lokalisation <p>Zusätzlich Nachweis der zeitlichen Dissemination durch:</p> <ul style="list-style-type: none"> • gleichzeitigen Nachweis von Gadolinium-aufnehmenden und nicht-aufnehmenden Läsionen im MRT oder • Nachweis einer neuen T2- und/oder Gadolinium-aufnehmenden Läsion im Verlaufs-MRT oder • Abwarten eines weiteren Schubes
<p>Schleichende neurologische Verschlechterung, V.a. PPMS</p>	<p>Fortschreitende neurologische Verschlechterung für mindestens 1 Jahr und mindestens 2 von 3 der folgenden Kriterien:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nachweis der räumlichen Dissemination durch ≥ 1 T2-Läsion in MS-typischen Lokalisationen • Nachweis der räumlichen Dissemination im Rückenmark durch ≥ 2 spinale T2-Läsionen • positiver Liquorbefund: oligoklonale Banden und/oder autochthone IgG-Synthese

(modifiziert nach Polman et al. 2011)

1.1.7 Therapieprinzipien

Eine kausale Therapie der multiplen Sklerose ist bis heute nicht möglich. Stattdessen beinhaltet die Behandlung im Wesentlichen die Akuttherapie des Schubes, die Modifikation des Krankheitsverlaufes durch Immunsuppression und -modulation sowie eine symptomatische Therapie der Begleitscheinungen, die sowohl medikamentös als auch nicht medikamentös die individuellen Beschwerden lindern und funktionelle Fähigkeiten der Patienten verbessern sollte – Physio-, Ergo- und Logopädie sowie eine psychologische

Therapie mit eingeschlossen. Die Therapieregime für verschiedene Verlaufsformen der MS unterscheiden sich stark (Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012, Rubin 2013). In Deutschland werden Therapieleitlinien gemeinsam vom Kompetenznetz Multiple Sklerose und der Deutschen Gesellschaft für Neurologie veröffentlicht (Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012). Tabelle 1.2 zeigt die aktuelle Empfehlung zur Stufentherapie.

Tabelle 1.2: Stufentherapie der multiplen Sklerose

Indikation		CIS	RRMS	SPMS	
Verlaufsmodifizierende Therapie	hochaktiver Verlauf		<i>1. Wahl</i> Alemtuzumab Fingolimod Natalizumab <i>2. Wahl</i> Mitoxantron (Cyclophosphamid)* <i>3. Wahl</i> experimentelle Verfahren	mit aufgesetzten Schüben	ohne aufgesetzte Schübe
	milder oder moderater Verlauf	Glatirameracetat IFN- β_{1a} i.m. IFN- β_{1a} s.c. IFN- β_{1b} s.c.	Dimethylfumarat Glatirameracetat IFN- β_{1a} i.m. IFN- β_{1a} s.c. IFN- β_{1b} s.c. PEG-IFN- β_{1a} s.c. Teriflunomid (Azathioprin)* (IVIg)**	IFN- β_{1a} s.c. IFN- β_{1b} s.c. Mitoxantron (Cyclophosphamid)*	Mitoxantron (Cyclophosphamid)*
Schubtherapie	2. Wahl	Plasmaseparation			
	1. Wahl	Methylprednisolonpuls			

Substanzen nach alphabetischer Reihenfolge

* nur besondere Indikation

** nur postpartal im Einzelfall

(modifiziert nach Vorlage der Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012)

Die Therapiemöglichkeiten der **chronischen Verlaufsformen** der MS, insbesondere der PPMS, sind sehr beschränkt und nur wenige (SPMS) bzw. keine (PPMS) Medikamente zugelassen (Comi 2013, Gajofatto und Benedetti 2015). Allerdings konnten für den monoklonalen Antikörper Ocrelizumab, der eine Depletion CD20-positiver B-Zellen bewirkt, bei PPMS-Patienten gegenüber einem Placebo niedrigere Progressionsraten (sowohl klinisch als auch bildgebend) nachgewiesen werden (Montalban et al. 2017). Der Wirkstoff scheint auch bei der RRMS wirksam zu sein und befindet sich aktuell im Zulassungsverfahren (Hauser et al. 2017), (Roche Group Media Relations 2016).

Die **Therapie des Schubes** erfolgt i.d.R. mit Steroiden. Diese zeigen eine gute Wirksamkeit, können aber weder weitere Schübe verhindern noch langfristig die

Krankheitsprogression aufhalten (Filippini et al. 2000). In schweren, nicht auf Steroide ansprechenden Fällen wird ein Therapieversuch mit Plasmapherese empfohlen, die eine gute, aber z. T. mit schweren Nebenwirkungen behaftete Wirksamkeit hat (Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012, Weinshenker et al. 1999, Keegan et al. 2002, Schilling et al. 2006).

Für die **verlaufsmodulierende Therapie** stehen heute eine ganze Reihe Präparate zur Verfügung. Die β -Interferone (IFN- β) wirken vermutlich hauptsächlich über eine Modulation der Expression proinflammatorischer Zytokine und der T_H17-Zell-Differenzierung (Ramgolam et al. 2009, Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012). Bei Glatirameracetat handelt es sich um eine standardisierte Kombination der zufällig polymerisierten Aminosäuren Glutamat, Lysin, Alanin und Tyrosin mit ebenfalls antiinflammatorischer, neuroprotektiver Wirkung (McGraw und Lublin 2013, Blanchette und Neuhaus 2008). Teriflunomid wirkt zytostatisch auf sich schnell teilende T- und B-Lymphozyten (Brunetti et al. 2013). Dimethylfumarat verbessert die zelluläre Widerstandsfähigkeit gegen oxidativen Stress und erzielt damit zytoprotektive Effekte im ZNS (Scannevin et al. 2012). Die zugelassenen monoklonalen Antikörper wirken durch eine Depletion immunkompetenter Zellen (Alemtuzumab) oder verhindern, wie Natalizumab und Fingolimod, deren Übertritt in das ZNS (Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012, Pucci et al. 2011, Pawate und Bagnato 2015). Mitoxantron, vor allem als Chemotherapeutikum maligner Erkrankungen bekannt, reduziert die Anzahl zirkulierender B-Lymphozyten, inhibiert T-Helferzellen und stimuliert T-Suppressorzellen (Hartung et al. 2002, Martinelli Boneschi et al. 2013). Das Immunsuppressivum Azathioprin ist Sonderfällen vorbehalten, eine Behandlung mit Cyclophosphamid oder intravenösen Immunglobulinen ist nicht zugelassen und kann nur als Off-Label-Anwendung erfolgen (Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012). Eine Reihe weiterer verlaufsmodulierender Medikamente befindet sich in der Entwicklung bzw. im Zulassungsverfahren (Weinstock-Guttman 2013).

1.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Der experimentellen MS-Forschung stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung. Mit den **toxininduzierten Modellen**, wie dem Cuprizon-Modell, lassen sich gut De- und Remyelinisierungsvorgänge unabhängig von autoimmunen Prozessen untersuchen. Durch intrazerebrale Infektion mit murinem Theilervirus kann ein **Modell der viral induzierten Demyelinisierung** untersucht werden. Dabei ähnelt der Verlauf einer chronisch-progredienten MS (Batoulis et al. 2011). Am intensivsten untersucht ist jedoch die **experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis**, die nach Immunisierung mit ZNS-Bestandteilen ein weites Spektrum autoimmun-entzündlicher Reaktionen aufweist und hier genauer erläutert werden soll (Batoulis et al. 2011, van der Star et al. 2012).

1.2.1 Historische Entwicklung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis

Nach Durchführung der ersten Tollwut-Impfungen 1885 mit Emulsionen aus getrocknetem Rückenmark infizierter Kaninchen durch Louis Pasteur traten z.T. schwere, meist reversible, aber teils auch tödliche Lähmungserscheinungen bei Geimpften auf, die weder klinisch noch histologisch mit einer Tollwut zu vereinbaren waren (Baxter 2007). Ein Zusammenhang zu den verabreichten ZNS-Bestandteilen wurde vermutet und versucht, in Tierversuchen nachzuweisen, was schließlich Rivers et al. in Rhesusaffen gelang (Stuart und Krikorian 1930, Hurst 1932, Rivers et al. 1933, Rivers und Schwentker 1935). Eine schnellere Induktion der perivaskulär demyelinisierten, inflammatorischen Läsionen konnte durch die Verwendung eines Adjuvans mit abgetötetem *Mycobacterium tuberculosis* erreicht werden (Kabat et al. 1946). Obwohl ursprünglich zur Untersuchung der akuten disseminierten Enzephalomyelitis nach Impfungen gedacht, war eine Ähnlichkeit zu anderen demyelinisierenden Erkrankungen wie der MS augenscheinlich, sodass die experimentelle „allergische“ Enzephalomyelitis – heute meist experimentelle „autoimmune“ Enzephalomyelitis genannt – auf andere Tiere übertragen und erweitert wurde und so verschiedene Varianten entstanden (Wolf et al. 1947, Pachner 2011, Baxter 2007).

1.2.2 Aktuelle EAE-Modelle

Heute werden verschiedene Verfahren zur **aktiven Induktion** der EAE angewendet. Neben der Immunisierung mit Rückenmarkshomogenaten werden vor allem einzelne Bestandteile der Myelinscheiden mit Adjuvans appliziert. Dabei wird meist das komplette Freund-Adjuvans, eine Wasser-in-Öl-Emulsion mit abgetöteten Mykobakterien, seltener das inkomplette Freund-Adjuvans ohne Mykobakterien verwendet (Libbey und Fujinami 2011). Zusätzlich können zur Augmentation der EAE-Induktion in Mäusen *Bordetella pertussis* oder das Pertussis-Toxin genutzt werden, die in Abhängigkeit von Applikationszeitpunkt und gewähltem Mausstamm unterschiedliche Verlaufsformen der Erkrankung auslösen oder sogar protektiv wirken können (Tsunoda et al. 2000, Lehmann und Ben-Nun 1992, Ben-Nun et al. 1993). Dass nur Myelinbestandteile und nicht vollständiges ZNS-Gewebe zur EAE-Induktion benötigt werden, konnte bereits in den 1960er Jahren anhand des zytosolischen basischen Myelinproteins (*myelin basic protein*, MBP) nachgewiesen werden (Laatsch et al. 1962). Sukzessive folgten zahlreiche Epitope der Transmembranproteine Proteolipidprotein (PLP) und Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), die im Gegensatz zum MBP ZNS-spezifisch sind (Sobel et al. 1994, Amor et al. 1994).

Durch den Transfer von Zellen aus den Lymphknoten immunisierter Tiere kann eine EAE **passiv induziert** werden (Paterson 1960). Neben Myelin-spezifischen CD4⁺-T-Zellen vermögen auch CD8⁺-T-Lymphozyten eine solche Adoptiv-Transfer-EAE (AT-EAE)

auszulösen (Zamvil et al. 1985, Huseby et al. 2001, Ji und Goverman 2007). Die AT-EAE hat viel zum Verständnis der Effektorphase der EAE und der ablaufenden T-Zell-vermittelten inflammatorischen Prozesse beigetragen (Constantinescu et al. 2011, Gold 2006).

Heute werden meist Inzuchtstämme oder genetisch homogene Versuchstiere verwendet. Vor allem Mausmodelle sind aufgrund der verhältnismäßig einfachen genetischen Manipulierbarkeit und Verfügbarkeit suszeptibler Stämme geeignet (Gold 2006, Robinson et al. 2014).

Der klinische Verlauf der EAE variiert abhängig von der Wahl des Immunisierungsverfahrens und des Versuchstiers sowie dessen individueller Suszeptibilität (Libbey und Fujinami 2011). Auf diese Weise können sowohl schubförmige als auch primär und sekundär progrediente Verläufe der EAE erzeugt werden (Levy et al. 2010). Im Rahmen der „klassischen“ EAE werden die Mäuse meist nach einer Prodromalphase von 10 – 15 Tagen durch eine vom Schwanz aufsteigende Lähmung und Gewichtsverlust symptomatisch, die „atypische“ EAE zeigt einen weit heterogeneren Verlauf (Robinson et al. 2014, Stromnes und Goverman 2006).

1.2.3 Histopathologie und Immunopathologie der EAE

Obwohl die EAE vornehmlich das Rückenmark betrifft und sich MS vor allem zerebral oder zerebellär manifestiert, teilen beide zahlreiche histopathologische Merkmale, wie die perivaskulären Infiltrate, den augenscheinlichen Befall der weißen Substanz und die ausgeprägte Demyelinisierung bei relativem Erhalt der Axone (Procaccini et al. 2015, Wolf et al. 1947, Baxter 2007). Die sehr unterschiedlichen EAE-Modelle können die vielfältigen Krankheitsverläufe und pathologischen Muster der MS abbilden und weisen unterschiedliche Stärken und Schwächen auf (van der Star et al. 2012, Baker und Amor 2014). Als eine Art „Goldstandard“ hat sich die in C57BL/6J-Mäusen durch das MOG-Peptid 35-55 induzierte EAE etabliert, die eine progressive, nicht-remittierende Verlaufsform hervorruft (Ben-Nun et al. 2014, Mendel et al. 1995, Recks et al. 2011). Dieses EAE-Modell ist durch multifokale, teils konfluierende mononukleäre, inflammatorische Infiltrate und Demyelinisierung in der peripheren weißen Substanz des Rückenmarks gekennzeichnet (Day 2005). Die Infiltrate bestehen vor allem aus T- und B-Lymphozyten sowie – als wichtigste Effektoren der Gewebszerstörung – Makrophagen (Day 2005, Lassmann 2008).

Jahrzehntelang wurden die unter Einfluss von IL-12 differenzierten CD4⁺-T_H1-Zellen, die Interferon- γ (IFN- γ) sezernieren, als alleinige Effektor-T-Zellen angesehen, während T_H2-Zellen als protektiv galten (Domingues et al. 2010, Liblau et al. 1995). Dieses stark vereinfachte „T_H1-Paradigma“ wurde inzwischen jedoch durch zahlreiche Studien widerlegt. So konnte gezeigt werden, dass weder IFN- γ - noch IL-12- defiziente Mäuse eine erniedrigte EAE-Suszeptibilität aufweisen (Ferber et al. 1996, Becher et al. 2002, Gran et al.

2002). Vielmehr scheint ein Mangel (genetisch oder durch Antikörperbehandlung hervorgerufen) an IL-23, einem mit IL-12 strukturverwandten Zytokin, zu einer herabgesetzten Empfänglichkeit für eine EAE zu führen (Cua et al. 2003, Chen 2006). Unter Einfluss von IL-23 differenzieren naive T-Helferzellen allerdings zu den 2005 erstbeschriebenen T_H17 -Zellen, für die mittels adoptiven Transfers eine hohes enzephalitogenes Potenzial belegt wurde (Langrish et al. 2005). Tatsächlich können vermutlich sowohl T_H1 - als auch T_H17 -Lymphozyten eine EAE induzieren, wenn auch mit unterschiedlichem histopathologischen Muster und anderer Chemokinexpression im ZNS (Kroenke et al. 2008, Domingues et al. 2010).

Nach heutigem Erkenntnisstand scheint das Zytokin GM-CSF, das von T_H17 -, T_H1 - und womöglich weiteren Helferzellen gebildet wird, für die Enzephalitogenität der T-Helferzellen entscheidend zu sein (El-Behi et al. 2011, Kroenke et al. 2008, Grifka-Walk et al. 2015). T_H17 -Zellen zeigen eine hohe Plastizität und können einen zytotoxischen T_H1 -Phänotyp annehmen, aber vermutlich ebenfalls ein T_H2 -artiges Zytokinprofil entwickeln (Domingues et al. 2010, Cosmi et al. 2010). Widersprüchliche Studienergebnisse lassen bezüglich der Bedeutung der T-Helferzellen-Subpopulationen für die EAE noch zahlreiche Fragen offen (Batoulis et al. 2011). Ähnlich verhält es sich mit den $CD8^+$ -Zellen, die zwar einerseits die Immunantwort im Rahmen der EAE vermitteln können, denen aber andererseits regulatorische, protektive Effekte zugeschrieben werden (York et al. 2010, Linker et al. 2005, Montero et al. 2004).

B-Lymphozyten und Plasmazellen können vermutlich ebenfalls durch Antikörperbildung gegen ZNS-Bestandteile sowohl zur Pathogenese der MS als auch der EAE beitragen (Lassmann 2008). B-Zellen könnten dabei zusätzlich als proinflammatorische antigenpräsentierende Zellen agieren und regulatorische Aufgaben wahrnehmen (Weber et al. 2010). Eine B-Zell-Depletion kann jedoch in Abhängigkeit vom gewählten Modell und Zeitpunkt sowohl positiv als auch negativ den Verlauf einer EAE beeinflussen (Weber et al. 2010, Matsushita et al. 2008).

1.2.4 Kritik an der EAE

Zwischen EAE und MS bestehen offensichtliche Unterschiede: MS ist eine spontan auftretende Erkrankung, deren Auslöser nicht bekannt ist; die EAE wird aktiv induziert, meist mit starken Adjuvantien. Ein solcher „immunologischer Boost“ ist bei der MS nicht bekannt. Die EAE-Forschung findet zudem an genetisch homogenen Tieren statt, wodurch unmöglich die Heterogenität der MS-Population widergespiegelt werden kann (Gold 2006). Während im klassischen EAE-Modell in den Läsionen $CD4^+$ -Zellen dominieren, überwiegen die $CD8^+$ -Zellen in MS-Läsionen. Auch das Verteilungsmuster der EAE-Läsionen sowie der im klassischen EAE-Modell meist monophasische Krankheitsverlauf unterscheiden sich von der MS. Viele der im Tiermodell getesteten

therapeutischen Ansätze haben sich daher in der Therapie der MS als ineffektiv oder gar schädlich erwiesen (Sriram und Steiner 2005).

Dennoch ist die EAE auch heute noch ein etabliertes Modell. Wie in Kapitel 1.2.2 und 1.2.3 beschrieben sind zahlreiche weitere atypische EAE-Modelle entstanden, die einige Aspekte der MS besser abbilden. Ein großer Teil des Wissens über immunologische Prozesse sowie Wirkmechanismen neuer Therapien hat seinen Ursprung im Tiermodell. Trotz allem wird kein EAE-Modell das vollständige Krankheitsbild der MS simulieren können, sondern immer nur einzelne Teilbereiche (Steinman und Zamvil 2006, Gold 2006). Werden aber neue Erkenntnisse aus der MS-Forschung in das Tiermodell integriert und dieses kontinuierlich verbessert, wird die EAE auch zukünftig als nützliches Mittel zur Erforschung einzelner Gesichtspunkte der Erkrankung dienen können (Handel et al. 2011a).

1.3 Interleukin-3

Der Begriff „Interleukin-3“ wurde 1980 durch Ihle et al. für ein neu entdecktes Zytokin geprägt, das die Expression des für reife T-Lymphozyten vermeintlich spezifischen Enzyms 20- α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (20 α SDH) induzierte (Ihle et al. 1981). Dieses Bild von IL-3 wurde alsbald revidiert, da zum einen 20 α SDH bei verschiedenen proliferierenden hämatopoetischen Zelllinien nachgewiesen wurde und auch von anderen Zytokinen induziert werden konnte, zum anderen IL-3 ebenso auf weitere Zellreihen wirkte und Kolonie-stimulierende Aktivität entfaltete (Garland et al. 1982, Garland und Dexter 1982, Hapel et al. 1985, Ihle et al. 1983). Da das Zytokin von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen und benannt wurde, existieren einige synonym zu verwendende Bezeichnungen, wie *persisting cell-stimulating factor*, *mast cell growth factor* oder *multi colony-stimulating factor* (multi-CSF) (Clark-Lewis und Schrader 1988). Obwohl „multi-CSF“ gut die weitreichenden Effekte sowohl auf Zellen der lymphatischen als auch der myeloischen Reihe bzw. deren Vorläuferzellen widerspiegelt, konnte sich „Interleukin-3“, das fälschlicherweise eine rein leukozytäre Wirkung vermuten lässt, durchsetzen (Metcalf 1986). Heute wird IL-3 wie GM-CSF, der Granulozytenkolonie-stimulierende Faktor und der Monozytenkolonien-stimulierende Faktor zu den Kolonie-stimulierenden Faktoren gezählt (Metcalf 1990). Mit GM-CSF und Interleukin-5 zählt IL-3 zu den Zytokinen der GM-CSF/IL-3/IL-5-Rezeptorfamilie (Goodall et al. 1993). Für das mit IL-3 eng verwandte GM-CSF wird heute eine wichtige Rolle bei der Induktion der EAE angenommen (Ponomarev et al. 2006, El-Behi et al. 2011).

1.3.1 IL-3-Gen und Proteinstruktur

Die benachbarten IL-3- und GM-CSF-Gene befinden sich in einem Cluster mit anderen hämatopoetisch wichtigen Genen auf dem langen Arm von Chromosom 5 (Le Beau et al. 1987, van Leeuwen et al. 1989). Humanes IL-3 (hIL-3) wird zunächst als ein aus 152

Aminosäuren bestehendes Protein synthetisiert, durch Abspaltung eines Signalpeptids und Glykosylierung entsteht ein 133-Aminosäuren-Glykoprotein, das zwei für Faltung und biologische Aktivität wichtige Cysteinreste beinhaltet (Yang et al. 1986, Dorssers et al. 1987, Otsuka et al. 1988, Yang und Clark 1988). Interleukin-3 bildet vier *up-up-down-down*-ausgerichtete α -Helices aus und gehört damit zu einer Gruppe von Zytokinen, denen allen die vier α -Helices gemein sind (Mott und Campbell 1995, Feng et al. 1996). Innerhalb dieser Gruppe besteht eine besondere Ähnlichkeit zu GM-CSF und IL-5 (Feng et al. 1996). Bedingt durch einen Einzelnukleotid-Polymorphismus im IL-3-Gen und folgende Änderung in der Aminosäuresequenz existiert mindestens eine weitere IL-3-Variante, die sich in ihrer Wirkung vermutlich z.T. unterscheidet (Dorssers et al. 1987, Gillis et al. 1988, Jeong et al. 1998, Schweiger et al. 2001).

Im Gegensatz zum hIL-3 wird das murine Interleukin-3 (mIL-3) als ein aus 166 Aminosäuren bestehendes Protein kodiert, nach Abspaltung des Signalpeptides und weiterer Prozessierung verbleiben 134 Aminosäuren im Glykoprotein, das ebenfalls eine 4- α -Helices-Faltung einnimmt (Fung et al. 1984, Yokota et al. 1984, Yao et al. 2011).

1.3.2 IL-3-Rezeptor

Die IL-3-Rezeptoren werden in eher kleiner Anzahl exprimiert, allerdings variieren die Studienergebnisse hier erheblich in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie und Spezies. So werden für murine, IL-3-abhängige Zelllinien Rezeptorzahlen *in vitro* von unter 500 bis 13.000 pro Zelle angegeben (Palaszynski und Ihle 1984, Park et al. 1986, Nicola und Metcalf 1986). In murinen, aber auch humanen Knochenmarkszellen fanden sich sogar noch geringere Rezeptorzahlen von < 60 – 130 pro Zelle (Nicola und Metcalf 1986, Park et al. 1989).

Der humane IL-3-Rezeptor (hIL-3R) besteht aus zwei Komponenten (Kuwaki et al. 1989). Die mit 120kDa größere β c-Untereinheit (hIL-3R β c) wird mit den Rezeptoren für GM-CSF und IL-5 geteilt, wohingegen die 70kDa kleine α -Untereinheit (hIL-3R α) IL-3-spezifisch ist (Budell et al. 1990, Kitamura et al. 1991b, Kitamura et al. 1991a, Tavernier et al. 1991). Aufgrund strukturell ähnlicher α -Untereinheiten und der gemeinsamen β c-Untereinheit werden die Rezeptoren der drei genannten Zytokine als GM-CSF/IL-3/IL-5-Rezeptorfamilie bezeichnet, welche wiederum zur übergeordneten Zytokin-Rezeptorfamilie der Klasse I gehört (Goodall et al. 1993, Bazan 1990b, Abbas et al. 2014). Die extrazelluläre Region der Rezeptoren dieser übergeordneten Familie enthält mindestens ein Zytokinbindungsmodul, das aus zwei Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen besteht. Dabei sind vier Cysteinreste in der N-terminalen und eine WSXWS-Sequenz (W = Tryptophan, S = Serin, X = beliebige Aminosäure) in der membrannahen Domäne enthalten. Wichtig für die Bindung der Liganden sind die α -Helices der entsprechenden Zytokine (Bazan 1990a).

Die humane α -Untereinheit, auch als CD123 bezeichnet, ist ein aus 360 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein mit einer großen extrazellulären Region (287 Aminosäuren), einem transmembranen Anteil (20 Aminosäuren) und einer mit 53 Aminosäuren recht kleinen intrazellulären Domäne, die keine typischen Signalsequenzen enthält (Kitamura et al. 1991a). Wie die anderen α -Untereinheiten der GM-CSF/IL-3/IL-5-Rezeptorfamilie verfügt hIL-3R α extrazellulär, zusätzlich zu der eigentlichen Bindungsstelle, über eine N-terminale Domäne, die die Bindungskapazität für IL-3 um ein Vielfaches erhöht (Goodall et al. 1993, Barry et al. 1997). Im Detail ist die hIL-3R α -Struktur noch nicht bestimmt, allerdings wird in Analogie zum IL-5-Rezeptor eine aus drei Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen bestehende Einheit vermutet (Broughton et al. 2014b, Hercus et al. 2013). IL-3 bindet an hIL-3R α nur schwach und benötigt die β c-Untereinheit, die selbst keine Bindung mit dem Zytokin einzugehen scheint, zur Bildung des hochaffinen hIL-3-Rezeptors (Kitamura et al. 1991a). Humaner und muriner IL-3R α (mIL-3R α) existieren in zwei Isoformen, die möglicherweise entsprechend verschiedene intrazelluläre Prozesse auslösen können (Chen et al. 2009, Mirza et al. 2010).

Die aus 881-Aminosäuren bestehende menschliche β c-Rezeptoruntereinheit bildet extrazellulär ein verwundenes, bogenförmiges Dimer, dessen zwei Ketten aus jeweils vier Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen aufgebaut sind, wodurch zwei Zytokinbindungsmodule entstehen (Hayashida et al. 1990, Sato 1993, Carr et al. 2001, Carr et al. 2006). Weiter zählen zu den Bestandteilen eine kleine Transmembrandomäne sowie eine große intrazelluläre Region, die sich aus etwa 450 Aminosäureresiduen zusammensetzt (Bagley et al. 1997).

Wie für den GM-CSF-Rezeptor wird auch für IL-3R die Formation eines Dodekamers in Anwesenheit des Liganden vermutet, vgl. Abbildung 1.1 (Hansen et al. 2008, Dey et al. 2009, Broughton et al. 2014a). Weder α - noch β -Untereinheit besitzen selbst eine intrinsische Kinaseaktivität, stattdessen ist der Rezeptor Kinase-gekoppelt (Barry et al. 1997, Sakamaki et al. 1992, Morla et al. 1988). Vermutlich wird die Formation des Dodekamers benötigt, um die mit β c-assoziierte Januskinase 2 (JAK2) zu phosphorylieren (Dey et al. 2009).

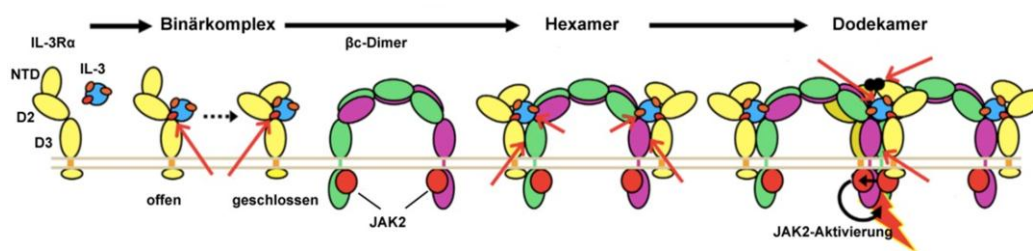


Abbildung 1.1: Struktur des IL-3-Rezeptors

IL-3R α und β c liegen zunächst dissoziiert vor, IL-3R α in offener und geschlossener Form. Aus IL-3R α und IL-3 entsteht ein binärer Komplex. Aus zwei Binärkomplexen und dem β c-Dimer bilden sich Hexamere. Ein Dodekamer besteht aus zwei Hexameren.

Abkürzungen: NTD: N-terminale Domäne; D: Domäne; JAK2: Januskinase 2

Roter Pfeil: mögliche Interaktionsstelle

(Abbildung modifiziert nach Broughton et al. 2014a [Creative-Commons-Lizenz CC BY 3.0])

Die zyttoplasmatischen Tyrosinkinassen können einerseits die Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (*signal transducers and activators of transcription*) aktivieren, andererseits werden durch Phosphorylierung von Tyrosinresten am Rezeptor auch zahlreiche andere Signalwege angestoßen (Groot et al. 1998, Hercus et al. 2013).

Bei der Maus existieren zwei verschiedene Varianten der β -Untereinheit des IL-3-Rezeptors (Gorman et al. 1990). Neben der murinen β c-Untereinheit (mIL-3R β c) existiert, vermutlich im Laufe der Evolution durch Genduplikation entstanden, eine mausspezifische, ebenfalls bogenförmige Variante mIL-3R β_{IL-3} , die IL-3 mit niedriger Affinität direkt binden kann oder wie mIL-3R β c mit mIL-3R α eine hochaffine IL-3-Bindung ermöglicht (Gorman et al. 1992, Murphy et al. 2004, Hara und Miyajima 1992, Carr et al. 2014). Die murine Rezeptoruntereinheit β_{IL-3} ist jedoch IL-3-spezifisch und ist nicht an einer Bindung von GM-CSF oder IL-5 beteiligt (Carr et al. 2014).

1.3.3 Funktionelle Bedeutung

Sowohl murines als auch humanes Interleukin-3 wird vor allem, aber nicht ausschließlich von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert (Otsuka et al. 1988, Niemeyer et al. 1989, Ihle 1992). Als weitere wichtige IL-3-Produzenten gelten Mastzellen, die über IL-3 an der Basophilenregulation beteiligt sind und so immunologische Reaktionen auf parasitäre Infektionen oder auch allergische Geschehen beeinflussen (Plaut et al. 1989, Wodnar-Filipowicz et al. 1989, Spiegl et al. 2008). Basophile Granulozyten können wiederum selbst zur IL-3-Sekretion angeregt werden und so autokrin wirken (Schroeder et al. 2009). Auch eosinophile sowie im geringeren Maße neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen sezernieren IL-3 (Kita et al. 1991, Wimperis et al. 1989). Neben den genannten Immunzellen können auch im Gehirn zahlreiche Zellen, wie Mikroglia, Astrozyten und sogar Neurone, IL-3 bilden (Appel et al. 1995, Konishi et al. 1994, Farrar et al. 1989).

Mit dem von allen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren breitesten Zielspektrum nimmt IL-3 auf Proliferation und Differenzierung von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, Progenitorzellen von Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen, Erythrozyten, Megakaryozyten und Mastzellen Einfluss und wirkt somit sowohl auf die lymphatische als auch auf die myeloische Zellreihe (Metcalf et al. 1986, Clark-Lewis und Schrader 1988). Dabei wirkt das Zytokin insbesondere auf zahlreiche sehr frühe und frühe Vorläuferzellen und nur wenige reifere Zellen, wie z.B. Mikrogliazellen, eosinophile und basophile Granulozyten sowie einige Monozytensubpopulationen (Giulian und Ingeman 1988, Barreda et al. 2004).

Während IL-3 für die Aufrechterhaltung der Hämatopoese beim Gesunden entbehrlich zu sein scheint, entfaltet es sein ganzes Potenzial im Rahmen immunologischer Reaktionen und kann als Schnittstelle zwischen Immunsystem und Hämatopoese gesehen werden (Ihle 1992). So wird IL-3 beispielsweise als Reaktion auf parasitäre Erkrankungen lokal vermehrt exprimiert und kann zu einer Erhöhung der Mastzell- und Basophilenzahlen beitragen (Lantz et al. 1998, Svetić et al. 1993). Nach Helmintheninfektionen fördert das Interleukin die Proliferation und Migration von Basophilen in Lymphknoten (Shen et al. 2008, Kim et al. 2010). Auch auf eosinophile Granulozyten hat IL-3 einen proinflammatorischen Einfluss und bewirkt eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber Parasiten (Rothenberg et al. 1988).

IL-3 kann in inflammatorischen Geweben zur Endothelzellproliferation und Angiogenese beitragen, hat aber ebenso regulatorischen Einfluss auf die Endothel-Leukozyten-Interaktion und kann so die Leukozytenrekrutierung mit beeinflussen (Brizzi et al. 1993, Brizzi et al. 2001). Die Adhäsion von Monozyten am Endothel kann durch IL-3 wie auch durch GM-CSF verstärkt werden (Elliott et al. 1990). IL-3 kann außerdem die Anzahl dendritischer Zellen erhöhen, deren Antigenpräsentationskapazität verbessern und so zu einer vermehrten T-Zell-Aktivierung führen (Storozynsky et al. 1999).

1.3.4 Mögliche Rolle in Krankheitsprozessen

Interleukin-3 wird in Zusammenhang mit verschiedenen malignen Erkrankungen gebracht. Sowohl eine erhöhte IL-3-Produktion als auch eine Überexpression des IL-3R α (CD123) auf malignen Zellen wurden bei verschiedenen leukämischen Erkrankungen beobachtet, sodass eine autokrine Wachstumsförderung durch IL-3 vermutet werden kann (Jiang et al. 1999, Liu et al. 2015). Im Rahmen solider Tumorerkrankungen kann IL-3 vermutlich durch Stimulation der Neoangiogenese zu Tumorwachstum beitragen (Dentelli et al. 2004).

Darüber hinaus wird das Zytokin bezüglich einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen untersucht. So gehen Erkrankungen wie Asthma bronchiale, allergische Rhinitis, atopische Hauterkrankungen oder entzündliche Darmerkrankungen mit einer Eosinophilie einher. Dabei ist IL-3, wie IL-5 und GM-CSF, in das Priming der eosinophilen Granulozyten involviert und inhibiert gleichzeitig die Apoptose der Granulozyten (Lampinen et al. 2004).

Des Weiteren wird für Interleukin-3 in Zusammenhang mit chronischer Urtikaria eine wachstums- und differenzierungsfördernde sowie Apoptose-hemmende Wirkung auf die Basophilen vermutet, letztlich mit einer erhöhten Histaminausschüttung einhergehend (Lourenço et al. 2008).

Zahlreiche neurologische Erkrankungen sind mit deutlich erhöhten Spiegeln einiger Zytokine im ZNS assoziiert (Zhao und Schwartz 1998). Angesichts der hier bereits beschriebenen proinflammatorischen Wirkungen von IL-3 liegt zudem eine Beteiligung an der Pathogenese neuroinflammatorischer Krankheitsbilder nahe. Tierexperimentell deuten Versuche mit transgenen Mäusen, die ausgeprägte neurologische Störungen durch eine vermehrte astrozytäre IL-3-Expression entwickelten, in diese Richtung. Diese Tiere bilden vor allem in der weißen Substanz von Kleinhirn und Hirnstamm ausgeprägte demyelinisierte Plaques mit zahlreichen Makrophagen- und Mikrogliafiltraten aus, die eine Ähnlichkeit mit MS- oder EAE-Läsionen zeigten (Chiang et al. 1996). Hierzu passt der Nachweis einer IL-3-Sekretion durch myelinspezifische T-Helferzellen im Rahmen der EAE-Forschung (Hofstetter et al. 2005, Karulin et al. 2012, Sheng et al. 2014). Bemerkenswerterweise verursachte jedoch eine generelle IL-3-Überexpression in transgenen Mäusen klinisch und histologisch ein Bild, das mit seiner Motoneuron-Degeneration eher an eine amyotrophe Lateralsklerose denken lässt (Chavany et al. 1998).

Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen scheint eine relevante Rolle von IL-3 an Entzündungsprozessen auch im Rahmen der MS möglich. Zwar wies eine Genexpressionsstudie an postmortalen Proben von MS-Patienten eine vermehrte IL-3-Expression in den MS-Läsionen nach, doch überwog die Expression anderer, für eine T_H1 -Immunreaktion typischer Zytokine (Baranzini et al. 2000). Demgegenüber stehen Untersuchungen von Huberman et al. (1993), die bei RRMS-Patienten sogar erniedrigte IL-3-Spiegel in Überständen peripherer mononukleärer Zellen im Schub gegenüber stabilen Krankheitsphasen zeigten. Spekuliert wurde diesbezüglich, dass vermehrte Rezeptorexpression und Zytokinbindung hierfür verantwortlich gewesen wären. Insgesamt ist der Zusammenhang zwischen IL-3 und multipler Sklerose aber wenig erforscht, sodass eine abschließende Beurteilung bislang nicht möglich ist.

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Interleukin-3 ist ein besonders von aktivierten T-Lymphozyten und Mastzellen produziertes Zytokin, das erheblichen Einfluss auf Proliferation und Funktion hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen sowie einiger reifer Zellen hat. Seine wachstumsstimulierende Wirkung entfaltet das Zytokin vor allem im Rahmen immunologischer Reaktionen, zeigt dann deutlich proinflammatorische Eigenschaften und kann daher als Schnittstelle zwischen Immunsystem und Hämatopoese angesehen werden. So ist IL-3 an der Pathogenese einiger Autoimmun- und allergischer Erkrankungen beteiligt. Einige Untersuchungen lassen zudem eine wichtige Rolle im Rahmen

neuroinflammatorischer Erkrankungen, wie der multiplen Sklerose oder ihrem Tiermodell, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, vermuten. Für das eng mit IL-3 verwandte Zytokin GM-CSF, mit dem sich IL-3 zudem eine Rezeptoruntereinheit teilt, konnte bereits eine essentielle Bedeutung für die Induktion einer EAE nachgewiesen werden.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Interleukin-3 auf neuroinflammatorische Prozesse näher zu untersuchen. Hierfür sollte die Auswirkung von IL-3 und einem anti-IL-3-Antikörper auf die in Mäusen induzierte EAE anhand der Läsionslast und T-Zell-Infiltration in Rückenmarksquerschnitten sowie der klinischen Scores analysiert werden.

2 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Matthias Mack, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II am Klinikum der Universität Regensburg, durchgeführt. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, erfolgt eine Aufteilung dieses Kapitels in extern durchgeführte Arbeiten (Kapitel 2.1) und solche, die im hiesigen Institut für Neuropathologie (Kapitel 2.2) durchgeführt wurden.

2.1 Extern durchgeführte Arbeiten

Wir erhielten in Paraffin gebettete Rückenmarkspräparate aus insgesamt vier Experimenten. In einem ersten Versuch wurde der Einfluss von intraperitoneal (i.p.) verabreichtem IL-3 auf die EAE untersucht. Die weiteren Versuche dienten der Analyse des Effektes einer frühzeitigen i.p.-anti-IL-3-Antikörper-Applikation und beinhalteten Wiederholungsversuche mit leicht veränderten Therapieprotokollen.

2.1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um zum Versuchsbeginn 8-12 Wochen alte Mäuse vom C57BL/6 (H-2^b)-Stamm der Firma Charles River Deutschland (Charles River Laboratories, Research Models and Services Germany, GmbH, Sulzfeld, Deutschland).

Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universität Regensburg unter einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Futter und Wasser erhielten die Tiere ad libitum.

Alle Tierversuche wurden von den vor Ort zuständigen Behörden genehmigt.

2.1.2 Verwendete Materialien und Chemikalien

Die verwendeten Materialien und Chemikalien sind in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.1: In externen Versuchen verwendete Antikörper

Bezeichnung	Klon	Hersteller	Verabreichung
Ratte-anti-Maus-IL-3, LS-C149564	MP2-8F8 (IgG, monoklonal)	LifeSpan BioSciences ¹	50 µg in 200 µl PBS
ChromPure Ratten-IgG, 012-000-003	-	Jackson ImmunoResearch ²	50 µg in 200 µl PBS

1) LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, WA, USA

2) Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, UK

Tabelle 2.2: In externen Versuchen verwendete Zytokine, Adjuvantien und weitere Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Inkomplettes Freund-Adjuvans, F5506	Sigma-Aldrich ¹
MOG-Peptid 35-55 (MOG ₃₅₋₅₅) (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK)	EZBiolab ²
Mycobacterium butyricum, 264010	Becton Dickinson France ³
Pertussis-Toxin von Bordetella pertussis, P7208	Sigma-Aldrich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA), P 3688	Sigma-Aldrich
Peptide-N-Glycosidase F	New England Biolabs ⁴
Rekombinantes murines IL-3	PeptoTech ⁵

- 1) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 2) EZBiolab Inc., Carmel, IN, USA
- 3) BD Diagnostic Systems Europe, Becton Dickinson France, Le Pont de Claix, Frankreich
- 4) New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
- 5) PeptoTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA

2.1.3 EAE-Induktion und Behandlung der Mäuse

An Versuchstag 0 erhielt jedes Tier zur **Immunsierung** eine subkutane Injektion von insgesamt 100 µl einer MOG-Peptid-Emulsion, verteilt auf beide Flanken. Diese Emulsion beinhaltete 200 µg MOG-Peptid 35-55 in komplettem Freund-Adjuvans, bestehend aus inkomplettem Freund-Adjuvans mit Zusatz von 1 mg Mycobacterium butyricum. Des Weiteren wurde den Mäusen an Tag 0 und 2 intraperitoneal 0,25 µg Pertussis-Toxin in 200 µl Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) mit 1%igem bovinen Serumalbumin verabreicht.

Zur **Untersuchung des Einflusses von Interleukin-3** erfolgte bei je 15 Tieren ab Tag 5 täglich bis Versuchsende (Tag 22) eine i.p.-Applikation von entweder 200 ng IL-3 in 200 µl PBS oder nur 200 µl PBS in der Kontrollgruppe.

In insgesamt drei Versuchen wurde der **Effekt des anti-IL-3-Antikörpers** analysiert. Dafür erhielten zunächst je 15 Tiere ab Tag 0 täglich bis Versuchsende (Tag 20) entweder i.p. 50 µg Ratten-IgG in 200 µl PBS (Kontrollgruppe) oder 50 µg anti-IL-3-Antikörper in 200 µl PBS. Im Rahmen eines weiteren Experimentes mit je 10 Tieren pro Gruppe wurde der Therapieeffekt der genannten i.p.-Dosen nach kürzerer Behandlung (11 Tage) überprüft. In einem dritten anti-IL-3-Antikörperversuch wurde neben der Kontroll- und anti-IL-3-Gruppe eine weitere Gruppe mit deglykosyliertem anti-IL-3-Antikörper 14 Tage ab Tag 0 behandelt und bis zu der Tötung an Tag 21 beobachtet. Die Deglykosylierung des Antikörpers wurde mit Peptide-N-Glycosidase F über Nacht bei 37°C (2000 Einheiten Enzym pro 1 mg Antikörper) durchgeführt.

Die Tötung der Tiere erfolgte mittels CO₂, dann Fixierung nach Organentnahme in Formaldehyd und anschließend Einbettung in Paraffin. Einen zusammenfassenden Überblick über die Behandlungsprotokolle gibt Tabelle 2.3.

Tabelle 2.3: Überblick über die verschiedenen Behandlungsprotokolle

Bezeichnung	Intraperitoneale Dosis	Anzahl Tiere / Präparate	Beginn	Ende / Tötungstag
IL-3	200 ng IL-3 in 200 µl PBS vs.	15 / 15	Tag 5	Tag 22 / 23
	200 µl PBS	15 / 12		
anti-IL-3	50 µg Ratten-IgG in 200 µl PBS vs.	15 / 14	Tag 0	Tag 20 / 21
	50 µg anti-IL-3-Antikörper in 200 µl PBS	15 / 13		
anti-IL-3 (kurz)	50 µg Ratten-IgG in 200 µl PBS vs.	10 / 10	Tag 0	Tag 10 / 11
	50 µg anti-IL-3-Antikörper in 200 µl PBS	10 / 10		
anti-IL-3 (deglykosyliert)	50 µg Ratten-IgG in 200 µl PBS vs.	15 / 15	Tag 0	Tag 13 / 21
	50 µg anti-IL-3-Antikörper in 200 µl PBS vs.	15 / 13		
	50 µg deglykosylierter anti-IL-3-Antikörper in 200 µl PBS	15 / 15		

2.1.4 Verwendeter EAE-Score

Für die klinische Beurteilung der EAE-Symptomatik wurde der in Tabelle 2.4 dargestellte dimensionslose Score verwendet. Die Erhebung erfolgte gegenüber der Behandlung geblendet. Für den anti-IL-3 (kurz)-Versuch wurden keine klinischen Daten erfasst.

Tabelle 2.4: EAE-Score

Score	Klinik
0	Keine Symptome
1	Alleinige Schwanzlähmung
2	Schwäche der Hinterbeine
3	Vollständige Lähmung eines oder beider Hinterbeine
4	Vollständige Lähmung der Hinterbeine und Schwäche eines oder beider Vorderbeine
5	Vollständige Paralyse aller Beine oder Tod

2.2 Am Institut für Neuropathologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen durchgeführte Arbeiten

2.2.1 Zur Verfügung stehende Präparate

Die aus Regensburg bereitgestellten Maus-Rückenmarkspräparate waren bereits in Paraffin eingebettet. Aufgrund der Längsausrichtung bzw. der zum Teil gewundenen Lage der Präparate im Paraffinblock war ein Schneiden in Rückenmarksquerschnitte unmöglich. Anhand erster, durch die ungünstige Lage im Paraffinblock bedingt, teils in Längs-, teils in schräger Ausrichtung geschnittener Präparate (vgl.

Abbildung 2.1) wurde eine schlechte Vergleichbarkeit der Präparate untereinander dokumentiert. Daraufhin wurde die Entscheidung getroffen, die Präparate zu entparaffinieren und neu in Querausrichtung in Paraffinblöcke einzubetten, um vergleichbare Querschnitte erhalten zu können.



Abbildung 2.1: Ausrichtung der Präparate im Paraffinblock

Die heterogene Schnittführung durch die Rückenmarkspräparate resultierte in z.T. stark differierenden Flächenverhältnissen zwischen weißer und grauer Substanz und erschwerte insgesamt die Auswertung.

2.2.2 Durchführung der Färbungen

Zur Beurteilung der Läsionslast wurde eine histologische Färbung der Rückenmarksquerschnitte (vgl. Kapitel 2.2.2.1) durchgeführt. Mithilfe der ergänzend durchgeführten Immunhistochemie (vgl. Kapitel 2.2.2.2) konnte die T-Zell-Infiltration in den Querschnitten ermittelt werden.

2.2.2.1 Histologische Färbung

Die histologische Färbung erfolgte mit **Luxol-Fast-Blue/Perjodsäure-Schiff-Reagenz** (LFB/PAS). Das 1953 erstmals als Färbung beschriebene alkohollösliche Kupfer-Phthalocyanin Luxol-Fast-Blue erlaubt durch seine spezifische Affinität zu Neurokeratin eine gute Darstellung der Myelinscheiden. Zusammen mit anderen Färbungen lassen sich zudem sehr gute kombinierte Zell- und Markscheidenfärbungen realisieren (Kluver und Barrera 1953, Romeis 2010). Durch dementsprechende Ergänzung der PAS-Färbung stellen sich neben den türkisblauen Markscheiden Kapillaren rot, graue Substanz und demyelinisierte Läsionen blassrosa und Zellkerne blau oder violett dar.

Vor der eigentlichen Färbung der Schnitte musste die LFB-Lösung aus 1 g Luxol-Fast-Blue, 1000 ml Ethanol 96 % und 5 ml Essigsäure 10 % sowie die Lithiumcarbonatlösung 0,05 % und Perjodsäure 1 % in Aqua dest. hergestellt werden. Nach Auftragen der Rückenmarksquerschnitte auf den Objektträger erfolgte die Entparaffinierung durch Xylol und Xylol-Isopropanol-Gemisch. Anschließend wurde in absteigenden Alkoholkonzentrationen bis Isopropanol 90 % rehydriert, das Präparat in die LFB-Lösung eingestellt und über Nacht in den Wärmeschrank bei 60 °C verbracht. Nun erfolgte die Differenzierung für ca. eine Minute (nach visueller Kontrolle) in Lithiumcarbonatlösung 0,05 %, Isopropanol 70 % und

destilliertem Wasser. Nach erneuter zweimaliger Spülung mit Aqua dest. erfolgte die Färbung mit Perjodsäure 1% für fünf Minuten bei Raumtemperatur, dann Eintauchen in Leitungswasser für weitere fünf Minuten und zweimaliges gründliches Spülen mit destilliertem Wasser. Nun wurden die Schnitte für 20 min bei Raumtemperatur in das Schiff-Reagenz eingebracht. Nach Spülung unter fließendem Leitungswasser für fünf Minuten wurde die Gegenfärbung mit Häkalaunlösung für zwei Minuten und anschließend eine kurze Differenzierung in 1%iger Salzsäure-Alkohol-Lösung durchgeführt. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte für 5-10 min gebläut, dann in aufsteigender Alkoholreihe bis Isopropanol 100% dehydriert, kurz in Isopropanol-Xylol (Verhältnis 1:1) und dreimal für drei Minuten in Xylol eingebracht und schließlich eingedeckelt.

2.2.2.2 Immunhistochemische Färbung

Zur Darstellung der T-Zell-Infiltration erfolgte eine **CD3-Immunhistochemie**. Das CD3-Molekül ist für T-Zellen spezifisch und nicht-kovalent an den T-Zell-Rezeptor gebunden (Abbas et al. 2014, Chetty und Gatter 1994). Die Färbung erfolgte durch eine indirekte Immunmarkierung. Hierbei muss der primäre, gegen CD3 gerichtete Antikörper, um eine unspezifische Hintergrundmarkierung zu verhindern, aus einer anderen Spezies stammen als das Präparat. Zudem ist bei diesem Verfahren nicht der Primärantikörper markiert, sondern ein – in wieder einer anderen Tierspezies hergestellter – Sekundärantikörper. Dieser zweite Antikörper ist dann gegen IgG der Spezies, in der der Primärantikörper hergestellt wurde, gerichtet und bindet an dessen Fc-Region (Romeis 2010).

Ist der sekundäre Antikörper mit Biotin markiert, kann durch die Avidin-Biotin-Technik eine Signalverstärkung erfolgen. Das aus dem Hühnereiweiß stammende Protein Avidin weist vier Bindungsstellen mit hoher Affinität zu Biotin auf. Wird Avidin mit einem biotinylierten Marker (Biotinenzym oder Biotingold) gemischt, entsteht ein Komplex mit zahlreichen Biotinmarkern und einigen Avidinmolekülen. Alternativ kann Avidin direkt mit einem Enzym, beispielsweise wie in der vorliegenden Arbeit mit einer Peroxidase, gekoppelt werden. Hierdurch erhöht sich nochmals die Sensitivität des Verfahrens (Romeis 2010, Ramos-Vara 2005). Wird das Avidin nun auf das Präparat gegeben, bindet es den biotinylierten Antikörper. Auf diese Art und Weise können auch geringe Antigenmengen nachgewiesen werden, vgl. auch Abbildung 2.2 (Romeis 2010).

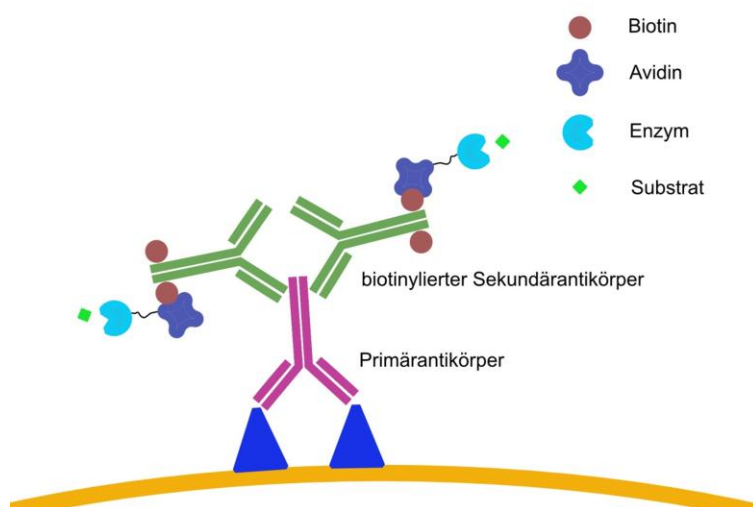


Abbildung 2.2: Indirekte Immunmarkierung mit enzymgekoppeltem Avidin
Schematische Darstellung der verwendeten Signalverstärkungsmethode.
(eigene Grafik in Anlehnung an Romeis 2010, Abb. 9.8)

Nach dem Auftragen der Präparate wurde zunächst die Entparaffinierung mit Xylol (10 min) und Xylol-Isopropanol-Gemisch und anschließend die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe bis Isopropanol 50 % (je 5 min) sowie eine Bewässerung in Aqua dest. (5 min) durchgeführt. Um die teils durch Fixierung, Dehydrierung oder Einbettung veränderten, nicht mehr zugänglichen Epitope der Antigene wieder für Antikörper zugänglich zu machen, erfolgte eine Antigendemaskierung mit Citratpuffer (10 mM) bei pH = 6,0 in der Mikrowelle bei 800 Watt für fünfmal drei Minuten, dabei wurde abwechselnd mit Aqua dest. oder Citratpuffer die verdunstete Menge ersetzt (Romeis 2010). Nach Abkühlung der Präparate im Puffer wurde mit Aqua dest. und PBS gespült, dann die endogenen Peroxidasen mit 3%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bei Raumtemperatur für 10 Minuten geblockt und erneut, dreifach mit PBS gespült. Ein Einstellen in Tritonlösung zur Verbesserung der Antikörperpenetration war bei dem verwendeten CD3-Antikörper nicht nötig. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine Vorinkubation mit fetalem Kälberserum (10%) in Phosphat-gepufferter Salzlösung für 10 min bei Raumtemperatur blockiert. Nun wurde nach dem Abgießen des Kälberserums der Primärantikörper (Kaninchen-anti-CD3, 1 : 150) ohne vorheriges Spülen hinzugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Jetzt konnte nach erneuter PBS-Spülung der sekundäre, biotinylierte Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG, 1 : 500) für 60 min bei Raumtemperatur aufgetragen werden. Im nächsten Schritt wurde nach nochmaliger PBS-Spülung mit Peroxidase-konjugiertem Avidin für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann erneut mit PBS gespült. Nun wurde 3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) und H_2O_2 30% zugegeben, wodurch die gekoppelte Peroxidase DAB oxidieren konnte und sich ein bräunlicher Farbniederschlag zeigte. Nach gründlicher Spülung mit Aqua dest. erfolgten nun die Gegenfärbung in Hämalaun für 30 Sekunden, Differenzierung in

Salzsäure-Alkohol-Lösung, Spülung mit Leitungswasser für 7 min, Entwässerung und Eindeckelung.

2.2.2.3 Verwendete Materialien

Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 2.5 aufgelistet, die benutzten Antikörper finden sich in Tabelle 2.6.

Tabelle 2.5: Verwendete Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol) reinst	Chemsolute ¹
3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) DAB-Lösung: 25 mg DAB 20 µl H ₂ O ₂ 30 % ad 50 ml PBS	Sigma-Aldrich ² Sigma-Aldrich Merck ³ AppliChem ⁴
Aqua dest. und bidest.	
Citratpuffer 10 mM	Merck
Ethanol 99%, vergällt mit Methylethylketon 1 %	Chemie-Vertrieb Hannover ⁵
Fetales Kälberserum (FCS) Fetales Kälberserum 10%: Verdünnung in PBS	Biochrom ⁶
Lithiumcarbonat Lithiumcarbonatlösung 0,05%: 0,5 g Lithiumcarbonat auf 1000 ml Aqua bidest.	Merck Merck
Luxol-Fast-Blue (LFB) LFB-Lösung: 1 g LFB 1000 ml Ethanol 96 % 5 ml Essigsäure 10 %	Clin-Tech Limited ⁷ Clin-Tech Limited Merck
Mayers Hämalaunlösung	Merck
Paraffin, Paraplast Plus	McCormick Scientific ⁸
Perjodsäure 1%ige Perjodsäure: 10 g Perjodsäure auf 1000 ml Aqua dest.	Merck Merck
Peroxidase-konjugiertes Avidin, ExtrAvidin, verdünnt 1 : 1000 mit FCS 10 %	Sigma-Aldrich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	AppliChem
Salzsäure 25 % 1%ige Salzsäure-Alkohol-Lösung: 1750 ml Isopropanol 100 % 750 ml Aqua dest. 25 ml 25%ige Salzsäure	Merck Chemsolute Merck
Schiff-Reagenz	Sigma
Wasserstoffperoxid 30 % Wasserstoff 3%: Verdünnung mit PBS	Merck
Xylol	Chemsolute

- 1) Chemsolute, Marke der Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
- 2) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 3) Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- 4) AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- 5) Chemie-Vertrieb Hannover GmbH & Co. Hannover KG, 30163 Hannover
- 6) Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- 7) Clin-Tech Limited, Unit G, Perram Works, Guildford, UK
- 8) McCormick Scientific Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Klon	Hersteller	Verdünnung
Primärantikörper Kaninchen-anti-CD3	SP7 (IgG, monoklonal)	DCS ¹	1 : 150 mit FCS 10%
Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-IgG; biotinyliert	polyklonal	Dianova ²	1 : 500 mit FCS 10%

- 1) DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
- 2) Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

2.2.3 Auswertung

2.2.3.1 Mikroskopie und Erfassung der Läsionslast und T-Zellinfiltration

Zur Auswertung der lichtmikroskopischen Präparate wurden die Schnitte zunächst mikroskopiert und digital mittels der 12,5 Megapixel CCD-Kamera DP71 von Olympus und des Programmes CellSens Dimension abfotografiert und als TIFF-Dateien (*tagged image file format*) gespeichert.

Die **Analyse der Läsionslast** erfolgte mithilfe eines Objektivs mit 4-facher Vergrößerung anhand der LFB/PAS-Färbungen. Setzten sich einzelne Rückenmarkquerschnitte aus mehreren Bildern zusammen, erfolgte eine Nachbearbeitung und ein Zusammensetzen der Querschnitte mit Photoshop CS4. Die weitere Auswertung erfolgte mittels des Bildbearbeitungs- und Verarbeitungsprogrammes ImageJ. Mithilfe des Programms wurden so die Gesamtfläche des Rückenmarksquerschnittes, der grauen und weißen Substanz sowie der Läsionen bestimmt. Die Läsionen ließen sich durch das verblasste Blau der ausgedünnten Myelinscheiden sowie die auffälligen Zellinfiltrationen in der weißen Substanz gut von gesundem Gewebe diskriminieren (vgl. Abbildung 2.3). Die erhaltenen Messwerte wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel erfasst und weiterverarbeitet. Für jedes Versuchstier wurde die Läsionslast (Gesamtfläche der Läsionen dividiert durch die Fläche der weißen Substanz in Prozent) berechnet.

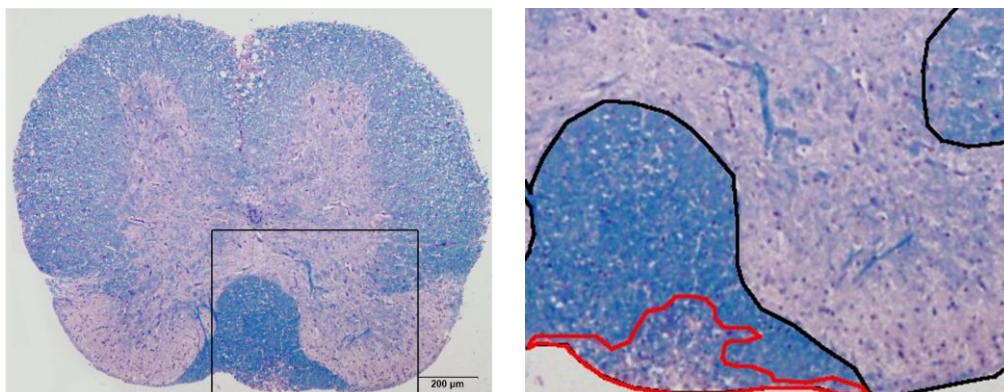


Abbildung 2.3: Übersichtsaufnahme in der LFB/PAS-Färbung und Ausschnittsvergrößerung

Links: Rückenmarksquerschnitt in der Übersichtsaufnahme (4x-Objektiv); der Messbalken entspricht 200 µm.

Rechts: Mithilfe der digitalen Vergrößerung ließen sich in der Ausschnittsvergrößerung graue und weiße Substanz (schwarz Markierung) sowie Läsionen (rote Markierung) vermessen.

Um die **Infiltration von T-Lymphozyten in das Rückenmark** zu bestimmen, wurden die immunhistochemischen CD3-Färbungen ausgewertet. Hier erfolgte zunächst eine Selektion des jeweils am stärksten betroffenen Querschnittes pro Tier mit dem Olympus BX51-Mikroskop und dem 40-fach-vergrößernden Objektiv. Zur weiteren Analyse wurden die Schnitte nun abfotografiert (Objektiv mit 4-facher und 10-facher Vergrößerung) und wie bereits oben beschrieben ebenfalls im TIFF nachbearbeitet, vgl. Abbildung 2.4.

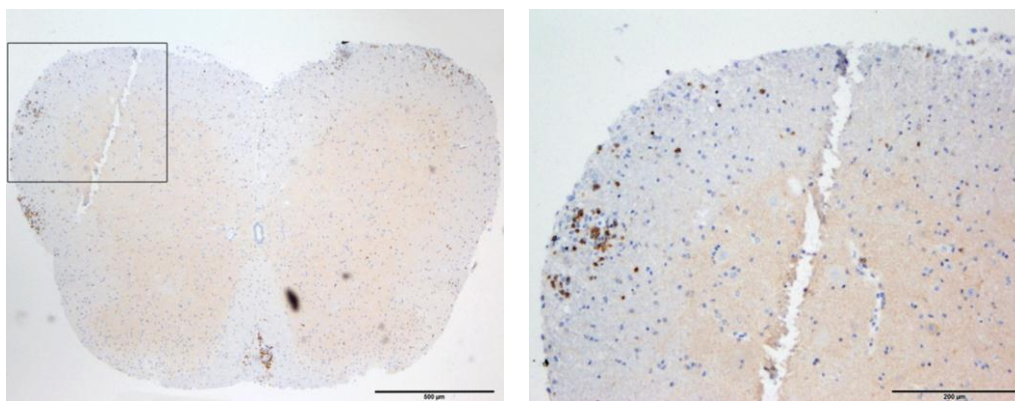


Abbildung 2.4: CD3-positive Zellen in der Übersichtsaufnahme und Ausschnittsvergrößerung

Links: Rückenmarksquerschnitt in Übersichtsaufnahme (4x-Objektiv); der Messbalken entspricht 500 µm.

Rechts: Vergrößerung des links markierten Ausschnittes (10x-Objektiv); der Messbalken entspricht 200 µm.

Anschließend erfolgte die Zählung der braunefärbten T-Zellen im Rückenmarksquerschnitt. In der Regel reichte für die Bestimmung der Zellzahl pro Querschnitt im digitalen Bild ein Objektiv mit 10-facher Vergrößerung aus, in unklaren Fällen wurde am Mikroskop mit bis zu 400-facher Originalvergrößerung gearbeitet

(Objektiv mit 40-facher und Okular mit 10-facher Vergrößerung). Die CD3-positiven Zellen ließen sich so gut an der charakteristischen Färbung erkennen (siehe Abbildung 2.5). Abschließend erfolgte die Berechnung der T-Zellen pro Quadratmillimeter der Querschnittsfläche im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel.

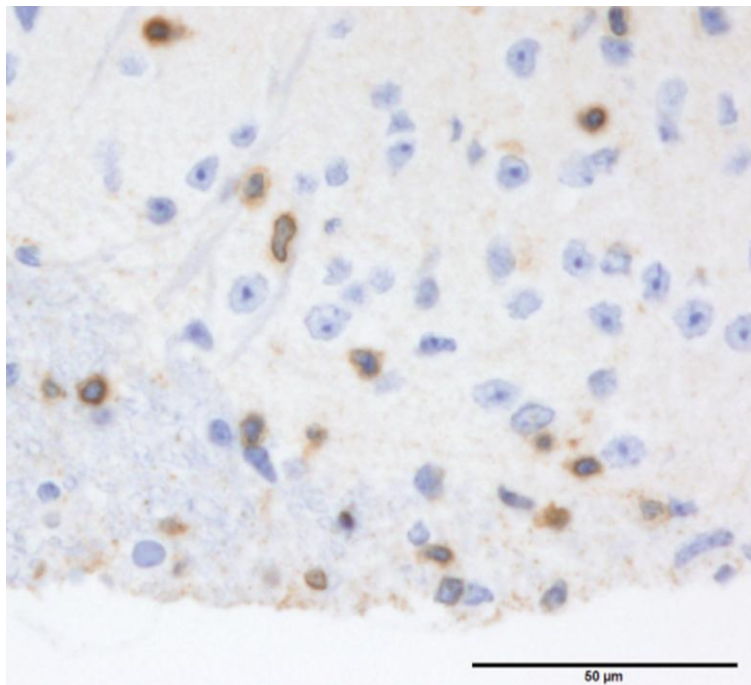


Abbildung 2.5: CD3-positive Zellen in der Detailaufnahme
Unter der starken Vergrößerung mit dem 40x-Objektiv lassen sich die CD3-positiven Zellen gut von anderen Zellen differenzieren. Der Messbalken entspricht 50 µm.

2.2.3.2 Statistik

Die Weiterverarbeitung der erfassten Daten sowie die statistische Analyse erfolgten mit Microsoft Excel und der Statistiksoftware GraphPad Prism 5.

Einen Vergleich der Erkrankungsschwere über den gesamten Zeitraum der Experimente erlaubte der aus der Fläche unter der Verlaufskurve (*area under the curve, AUC*) berechnete ebenfalls dimensionslose kumulative Score (Fleming et al. 2005).

In Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung, des Skalenniveaus und der Verteilung wurden für die erhobenen Daten der Mittelwert (MW) bzw. die Differenz der Mittelwerte (Δ MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und Konfidenzintervall (CI) oder Median und Quartile berechnet.

Die Normalverteilung wurde mit dem D'Agostino-Pearson-Omnibus-Test untersucht.

Im Rahmen der Signifikanzanalyse wurde zunächst ein Signifikanzniveau α von 0,05 festgelegt, ein p-Wert (Signifikanzwert) kleiner als 0,05 somit als statistisch signifikant bezeichnet. Ein p-Wert kleiner als 0,01 wurde als hoch-signifikant angesehen.

Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mit verschiedenen Verfahren, dabei wurden beim Vergleich zweier Gruppen nur zweiseitige Testverfahren durchgeführt. Für normalverteilte, intervallskalierte Daten und Varianzhomogenität wurde der parametrische t-Test angewendet, bei sich signifikant unterscheidenden Varianzen wäre entsprechend die Welch-Korrektur ergänzt worden. Der Mann-Whitney-U-Test wurde als nicht parametrisches Verfahren benutzt.

Die einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way analysis of variance, one-way ANOVA*), ggf. mit anschließendem Tukey-Kramer-Test, sollte zum Vergleich von mehr als zwei metrischen Datensätzen und nur einem veränderten experimentellen Faktor unter der Voraussetzung der Normalverteilung und homogener Varianzen angewendet werden. Alternativ wurde bei Fehlen dieser Voraussetzungen für eine ANOVA auf den Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von multiplen Vergleichen nach Dunn als Nachtest (*Dunn's multiple comparison test*), zurückgegriffen.

Mit der Korrelationsanalyse sollte der Korrelationskoeffizient nach Pearson für normalverteilte, mindestens intervallskalierte Daten ermittelt werden. Bei Fehlen dieser Vorbedingungen wurde die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt.

2.2.3.3 Verwendete Materialien

Für die Auswertung verwendete Arbeitsgeräte und Programme finden sich in Tabelle 2.7.

Tabelle 2.7: Verwendete Geräte und Software

Bezeichnung	Hersteller
12,5 Megapixel CCD-Kamera DP71	Olympus ¹
Lichtmikroskop BX51	Olympus
Microsoft Excel 2010	Microsoft Deutschland ²
Objektive (4-fach bis 40-fache Vergrößerung)	Olympus
Okular (10-fache Vergrößerung)	Olympus
Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems GmbH ³
cellSens Dimension 1.7.1	Olympus
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software, Inc. ⁴
ImageJ 1.47v	ImageJ (Open Source) ⁵

- 1) Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
- 2) Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
- 3) Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
- 4) GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
- 5) ImageJ (Open Source), Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA

3 Ergebnisse

Zur Ermittlung des Einflusses von Interleukin-3 und anti-IL-3 auf die EAE wurden jeweils der extern erhobene klinische EAE-Score sowie die im hiesigen Institut für Neuropathologie der Medizinischen Fakultät Göttingen bestimmte Läsionslast und T-Zell-Infiltration ausgewertet.

3.1 Einfluss von Interleukin-3 auf die EAE

Die Versuchstiere in diesem Experiment erhielten ab Tag 5 täglich bis Tag 22 intraperitoneal rekombinantes Interleukin-3.

Nicht alle Tiere entwickelten nach histologischen Kriterien (s. Abschnitt 3.1.2) tatsächlich eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis. Am ehesten ist in diesen Fällen von einer nicht gelungenen Induktion auszugehen, sodass diese Präparate bzw. der jeweilige EAE-Score von der statistischen Auswertung hier ausgenommen wurden.

3.1.1 Symptomatik und Verlauf

Erste Symptome wurden mithilfe des EAE-Scores in der IL-3-Gruppe ab dem 7. Tag nach Immunisierung erfasst, in der Kontrolle ab Tag 8. Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die Anzahl der symptomfreien Tage bis zur erstmaligen klinischen Manifestation der EAE. In der IL-3-Gruppe bestand eine breitere Streuung des Manifestationszeitpunktes, ein signifikanter Gruppenunterschied konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

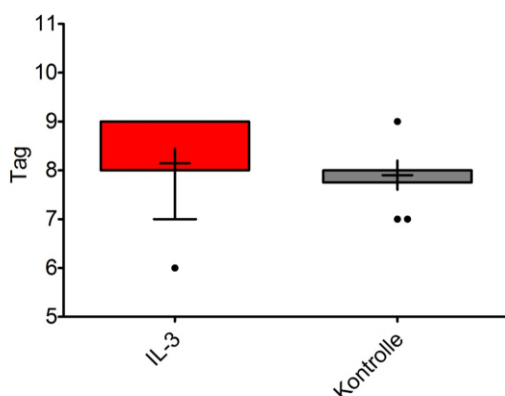


Abbildung 3.1: Beginn der EAE-Manifestation im IL-3-Versuch

Dargestellt sind die symptomfreien Tage bis zur erstmaligen klinischen Manifestation der EAE.

Die Boxplots zeigen die 25. und 75. Perzentile, den Median, Mittelwert (\pm), Tukey-Whiskers sowie ausreißerverdächtige Werte (\bullet). Tiere ohne Präparat oder mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen.

MW \pm SD: $8,1 \pm 0,9$ d (IL-3), $7,9 \pm 0,6$ d (Kontrolle); Median: 8 d (beide);

Δ MW: 0,2 d; 95%-CI: -0,4 – 0,9 d. Kein statistisch signifikanter Gruppenunterschied ($p = 0,4468$, zweiseitiger t-Test bei normalverteilten Daten); $n = 14$ (IL-3), $n = 10$ (Kontrolle).

Einen Eindruck über den Krankheitsverlauf gibt Abbildung 3.2, in der die gemittelten Symptomverläufe mit Standardfehlern der beiden Gruppen dargestellt sind. Auffallend war hier die ab Tag 14 zunehmende Tendenz erhöhter Score-Mittelwerte in der IL-3-Gruppe.

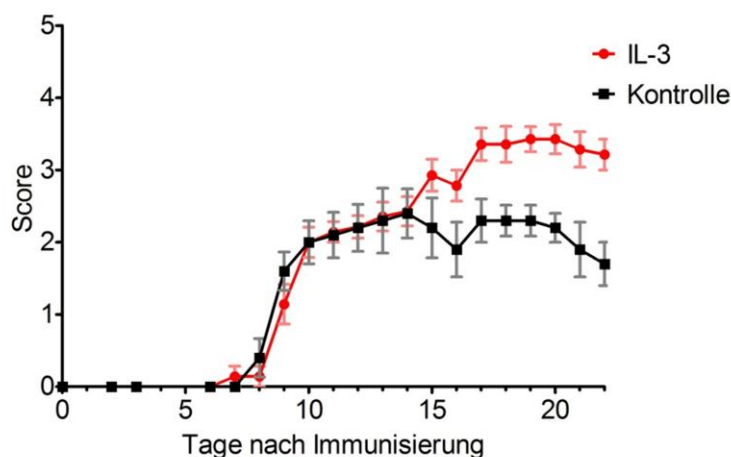


Abbildung 3.2: Klinische Verläufe im IL-3-Versuch

In dem Graphen sind Mittelwert und SEM in beiden Versuchsgruppen dargestellt (Tiere ohne Präparat oder mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen). Die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht verzeichnete SD ist in beiden Gruppen hoch: sie erreicht in der IL-3 Gruppe Werte bis 1,03 und in der Kontrollgruppe sogar bis 1,42.

Um einen Gruppenvergleich der EAE-Scores zu ermöglichen, wurden die kumulativen Scores der einzelnen Tiere ermittelt. Wie Abbildung 3.3 zeigt, bestätigte sich dadurch ein signifikant schlechterer klinischer Verlauf in der IL-3-Gruppe.

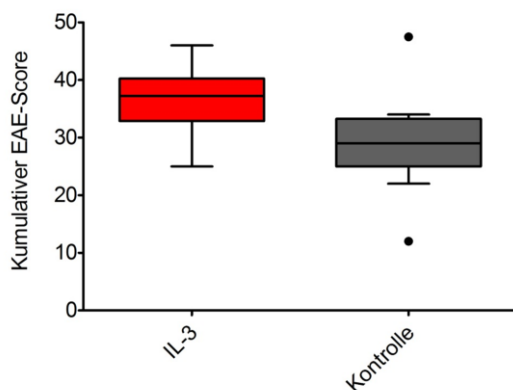


Abbildung 3.3: Vergleich der kumulativen EAE-Scores im IL-3-Versuch

Die Boxplots zeigen die 25. und 75. Perzentile, den Median, Tukey-Whiskers sowie ausreißerverdächtige Werte (•). Tiere ohne Präparat oder nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen.

Median: 37,3 (IL-3) und 29,0 (Kontrolle); Signifikanter Gruppenunterschied ($p = 0,0118$, zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test); $n = 14$ (IL-3), $n = 10$ (Kontrolle).

3.1.2 Vergleich der Läsionslast

Mit der LFB/PAS-Färbung ließen sich bereits in geringer Vergrößerung gut Läsionen von gesundem Gewebe differenzieren. Nicht alle Tiere zeigten nach dem zuvor festgelegten histologischen Kriterium (Läsion $\geq 0,1\%$ der weißen Substanz) tatsächlich auch

histologisch eine EAE, wobei der Anteil der histologisch bestätigt erkrankten Tiere in der IL-3-Gruppe leicht erhöht war (vgl. Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: EAE-Inzidenz in der IL-3- und Kontrollgruppe

Gruppe	EAE-Tiere*	Gesamt	Inzidenz [%]
IL-3	14	15	93%
Kontrolle	10	12	83%

* Tiere mit einer Läsionslast unter 0,1% wurden als gesund klassifiziert.

Im Vergleich nur der erkrankten Tiere zeigte sich eine statistisch hoch-signifikante Zunahme der Läsionslast durch die Behandlung mit IL-3 ($\Delta MW = 6,86\%$; 95%-CI: 2,76 – 10,95%; $p = 0,0022$; zweiseitiger t-Test). Abbildung 3.4 zeigt exemplarische Übersichtsaufnahmen in der LFB/PAS-Färbung sowie die Scatter-Dotplots der Auswertung.

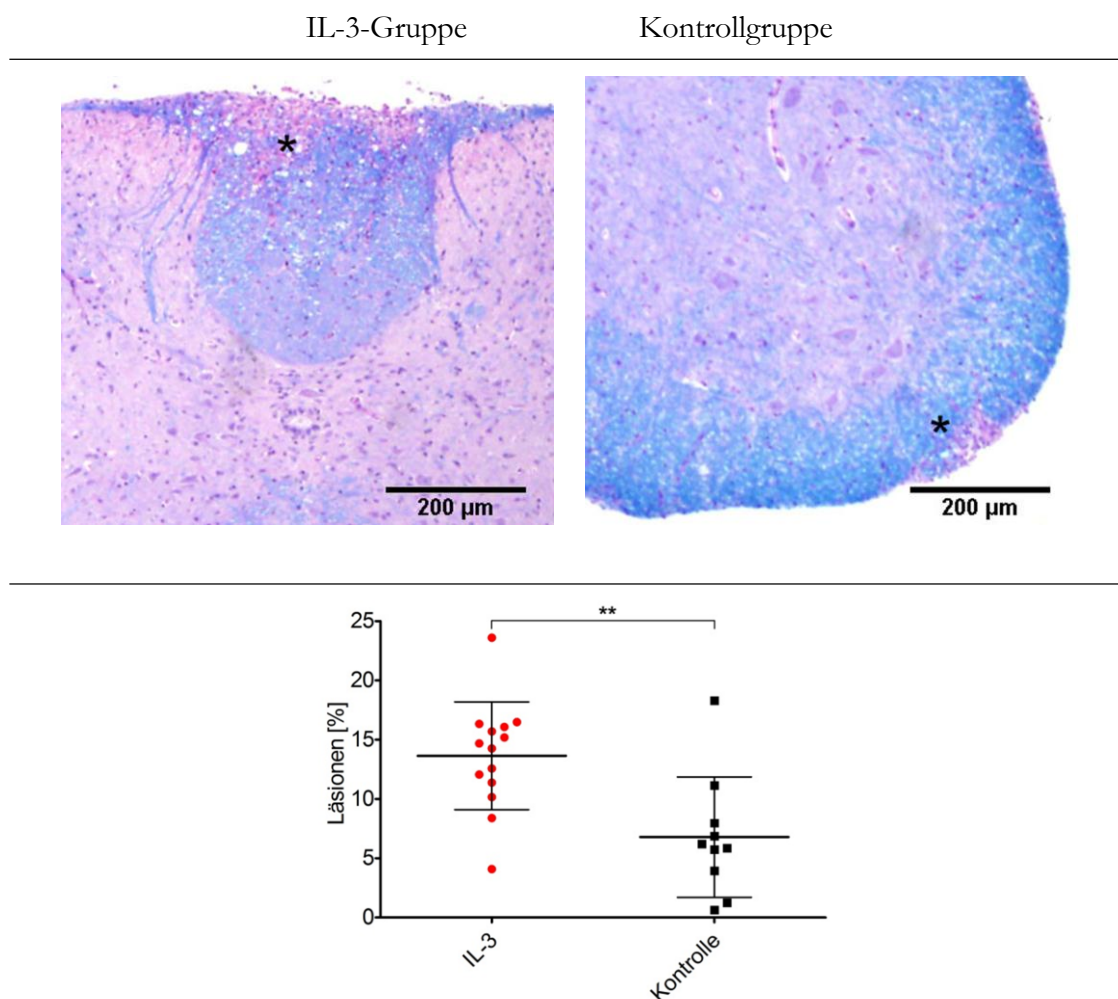


Abbildung 3.4: Einfluss von Interleukin-3 auf die Läsionslast

Oben: Exemplarische Übersichtsaufnahmen in der LFB/PAS-Färbung aus IL-3- und Kontrollgruppe mit 4x-Objektiv, Messbalken entsprechen 200µm; Läsionen mit * gekennzeichnet.

Unten: Läsionslast als prozentualer Anteil der entmarkten Bereiche in Bezug zur Gesamtfläche der weißen Substanz. Die Scatter-Dotplots zeigen Mittelwert und Standardabweichungen. Tiere mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen.

MW \pm SD: 13,65 \pm 4,54% (IL-3), 6,79 \pm 5,08% (Kontrolle); Median: 14,48% (IL-3), 6,04% (Kontrolle); Δ MW: 6,86%; 95%-CI: 2,76 – 10,95%. Statistisch hoch-signifikanter Gruppenunterschied (**p = 0,0022, zweiseitiger t-Test bei normalverteilten Daten); n = 14 (IL-3), n = 10 (Kontrolle).

Ein Anstieg der Läsionslast ging zudem mit einem erhöhten EAE-Score einher (Abbildung 3.5). So zeigte die Rangkorrelation nach Spearman einen Korrelationskoeffizienten von $r_s = 0,74$ (95%-CI: 0,47 – 0,88) bei einem Signifikanzwert von $p < 0,0001$.

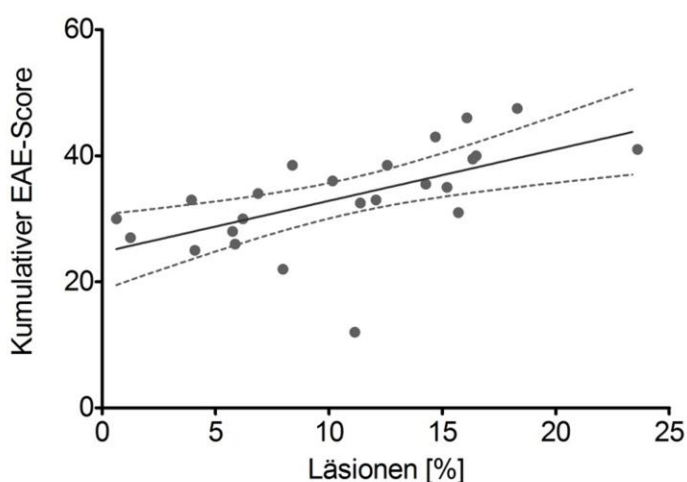


Abbildung 3.5: Kumulativer EAE-Score und Läsionslast im IL-3-Versuch
 Dargestellt sind kumulativer EAE-Score und Läsionslast sowie die Regressionsgerade mit 95%-Konfidenzband. Tiere mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen. Die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten erfolgte nach Spearman für ordinal (Score) und metrisch (Läsionslast) skalierte Daten.
 $r_s = 0,74$; 95 %-CI: 0,47 – 0,88; $p < 0,0001$; $n = 24$.

3.1.3 T-Zell-Infiltration

In den Übersichtsaufnahmen des Rückenmarks ließen sich die jeweils am stärksten betroffenen Querschnitte gut identifizieren und die Fläche berechnen.

Die Auswertung der T-Zellen (TZ) pro Quadratmillimeter der Rückenmarksquerschnitte zeigte zwar tendenziell erhöhte T-Zellzahlen in der IL-3-Gruppe. Unter Einbeziehung nur der erkrankten Tiere war der Mittelwert um $35,5 \text{ TZ/mm}^2$ sowie der Median um $22,5 \text{ TZ/mm}^2$ in der IL-3-Gruppe (MW \pm SD: $105,8 \pm 46,2 \text{ TZ/mm}^2$; Median: $98,3 \text{ TZ/mm}^2$) gegenüber der Kontrolle (MW \pm SD: $70,3 \pm 44,0$; Median: $75,80 \text{ TZ/mm}^2$) erhöht, vgl. Abbildung 3.6. Die statistische Auswertung konnte allerdings keinen signifikanten Gruppenunterschied belegen ($p = 0,1074$, zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilten Daten).

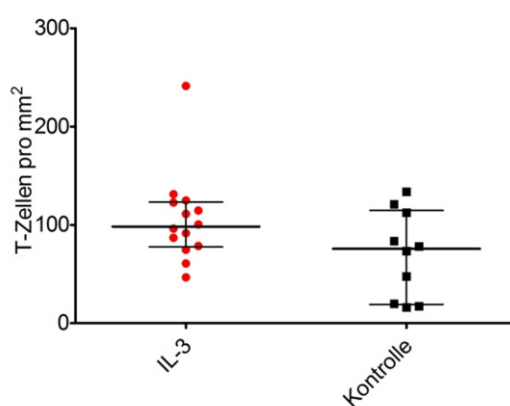
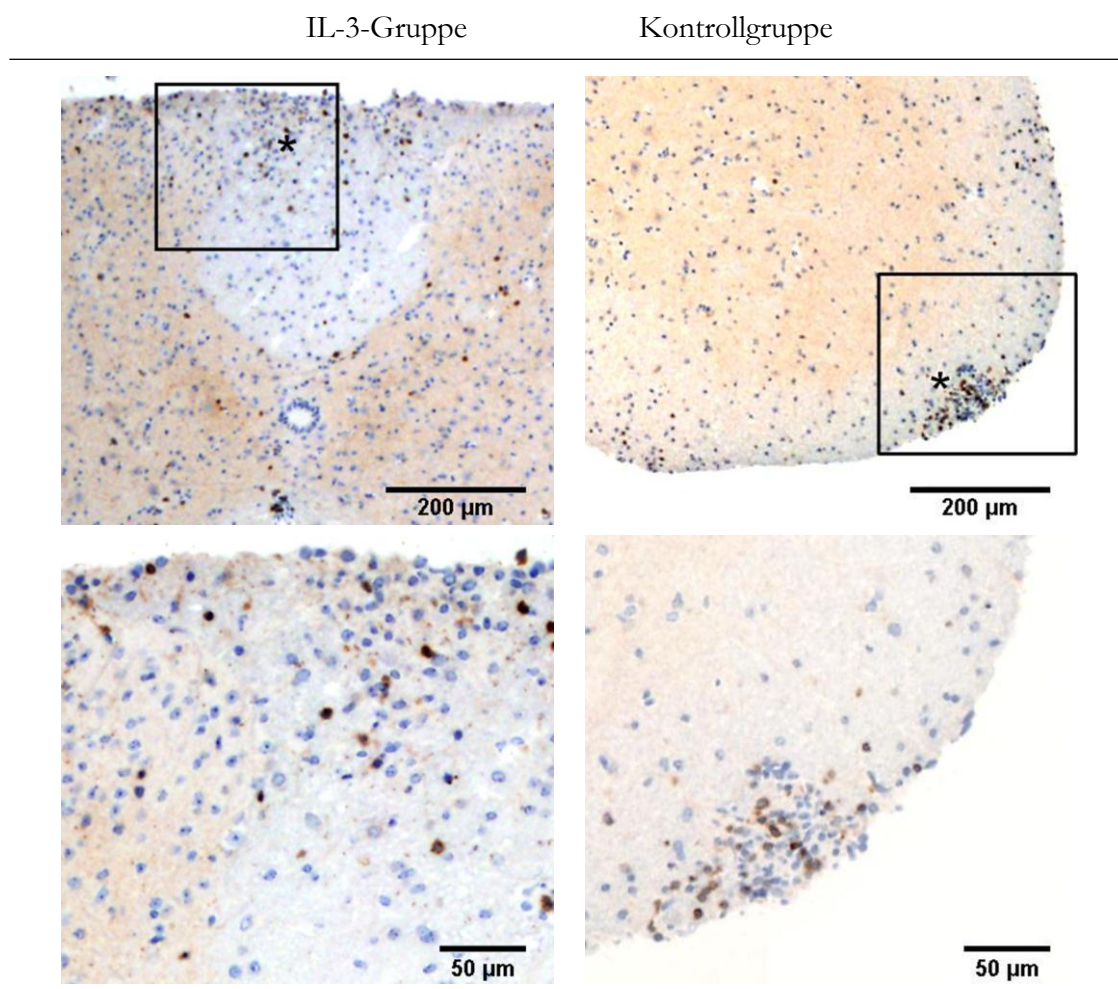


Abbildung 3.6: T-Zell-Infiltration unter IL-3-Therapie

Oben: Exemplarische Übersichtsaufnahmen in der CD3-Färbung aus der Gruppe der IL-3-therapierten Tiere und der Kontrollgruppe in verschiedenen Vergrößerungen (obere Reihe 4x-Objektiv, Messbalken entsprechen 200 µm, untere Reihe 10x-Objektiv, Messbalken entsprechen 50 µm); Läsionen mit * gekennzeichnet.

Unten: T-Zell-Infiltration als T-Zellen pro Quadratmillimeter Querschnittsfläche. Die Scatter-Dotplots zeigen den Median sowie den Interquartilsabstand. Tiere ohne Präparat oder mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen. Median: 98,30 TZ/mm² (IL-3), 75,80 TZ/mm² (Kontrolle); kein signifikanter Gruppenunterschied ($p = 0,1074$, zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilten Daten); $n = 14$ (IL-3), $n = 10$ (Kontrolle).

Der Zusammenhang zwischen Läsionslast und T-Zell-Infiltration wurde aufgrund der nicht normalverteilten Daten mit dem Spearman-Korrelationskoeffizient r_s untersucht. In Abbildung 3.7 sind die beiden Parameter in einem Streudiagramm aufgetragen. Mit zunehmender Läsionslast stieg auch die Anzahl der T-Zellen pro Quadratmillimeter: $r_s = 0,43$; $p = 0,0354$; $n = 24$.

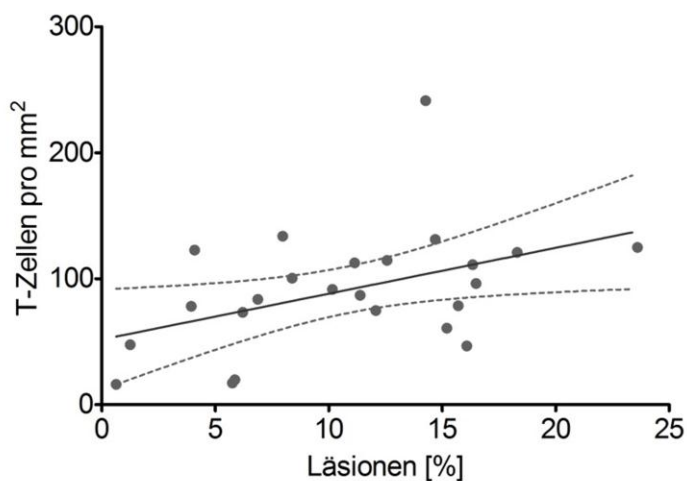


Abbildung 3.7: Läsionslast und T-Zell-Infiltration im IL-3-Versuch

Dargestellt sind Läsionslast und T-Zellen pro Quadratmillimeter Querschnittsfläche sowie die Regressionsgrade mit 95%-Konfidenzband. Tiere mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen. Die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten erfolgte nach Spearman für nicht normalverteilte Daten.

$r_s = 0,43$; 95%-CI: 0,02 – 0,72; $p = 0,0354$; $n = 24$.

Die Zahl der CD3⁺-Zellen korrelierte allerdings nicht mit dem kumulativen Score, vgl. Abbildung 3.8.

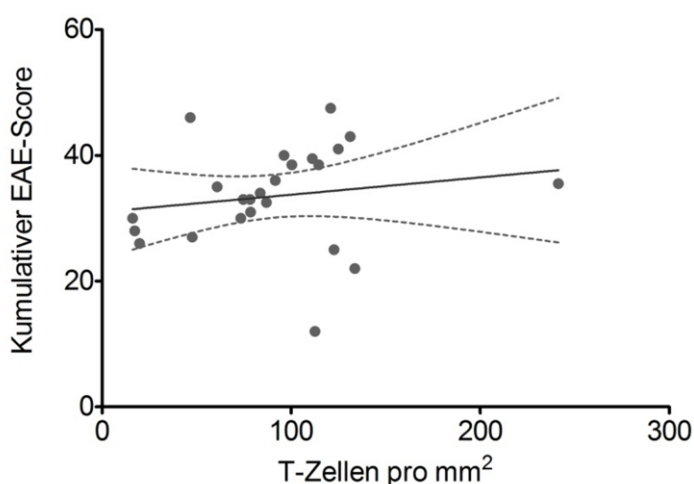


Abbildung 3.8: T-Zell-Infiltration und kumulativer Score im IL-3-Versuch
 Dargestellt sind T-Zellen pro Quadratmillimeter Querschnittsfläche und kumulativer EAE-Score sowie die Regressionsgrade mit 95 %-Konfidenzband. Tiere mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen. Die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten erfolgte nach Spearman für nicht normalverteilte Daten.
 $r_s = 0,28$; 95 %-CI: $-0,16 - 0,62$; $p = 0,1920$; $n = 24$.

3.2 Einfluss einer anti-IL3-Antikörper-Therapie auf die EAE

Der Einfluss der anti-IL-3-Antikörpergabe auf die EAE wurde zunächst in zwei Versuchen untersucht, die sich hinsichtlich der Versuchsdauer (21 bzw. 11 Tage) unterschieden. In beiden Experimenten erhielten die Tiere ab Tag 0 täglich anti-IL-3-Antikörper intraperitoneal bzw. Ratten-IgG (Isotypkontrolle). In einem dritten Versuch erhielt eine weitere Gruppe deglykosylierten anti-IL-3-Antikörper. Aus Gründen der Übersicht werden die genannten Versuche hier, wie in Tabelle 2.3 (S. 25) beschrieben, als anti-IL-3-, anti-IL-3 (kurz)- oder anti-IL-3 (deglykosyliert)-Versuch benannt.

Im Gegensatz zu dem IL-3-Versuch muss ein fehlender Nachweis von Läsionen in diesen Versuchen nicht zwangsläufig auf eine mangelhafte EAE-Induktion im entsprechenden Tier zurückgeführt werden (vgl. Kapitel 3.1, S. 35), sondern könnte auch durch die Verabreichung von anti-IL-3-Antikörper oder IgG bedingt sein. Aufgrund dessen erfolgte für diese Versuche die Betrachtung – soweit möglich – sowohl mit als auch ohne Berücksichtigung der nach histologischen Kriterien nicht erkrankten Tiere.

Auffallend in den hier beschriebenen Versuchen war ein insgesamt klinisch wie auch nach histologischen Merkmalen milder Verlauf der EAE in allen Versuchsgruppen einschließlich der Kontrollen.

3.2.1 Symptomatik und Verlauf

Der EAE-Score wurde nur in den beiden längeren Experimenten erhoben, von dem Kurzversuch lagen diesbezüglich keine Daten vor.

Unter Einbeziehung aller Tiere traten im **anti-IL-3-Versuch** sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe ab Tag 9 erste klinische Symptome auf. Dabei zeigten zwei der mit anti-IL-3-Antikörper behandelten Tiere (entsprechend 15,4%) während des gesamten Beobachtungszeitraumes keinerlei Ausfallserscheinungen, wohingegen alle Tiere der Kontrollgruppe symptomatisch wurden. Zudem bestand in der anti-IL-3-Gruppe eine wesentlich breitere Streuung des erstmaligen Auftretens neurologischer Auffälligkeiten. Insgesamt bestand jedoch kein signifikanter Gruppenunterschied bezüglich des Symptombeginns.

Wurden nur die nach histologischen Gesichtspunkten erkrankten Tiere berücksichtigt, verblieb lediglich eine geringe Anzahl an Tieren (6 in der Kontrollgruppe und 5 in der anti-IL-3-Gruppe). Auf die Signifikanzprüfung wurde hier daher verzichtet.

Abbildung 3.9 gibt einen Überblick über die Anzahl der symptomfreien Tage ab Behandlungsbeginn bis zur EAE-Manifestation (bzw. bis Versuchsende im Falle der nicht symptomatisch gewordenen Tiere).

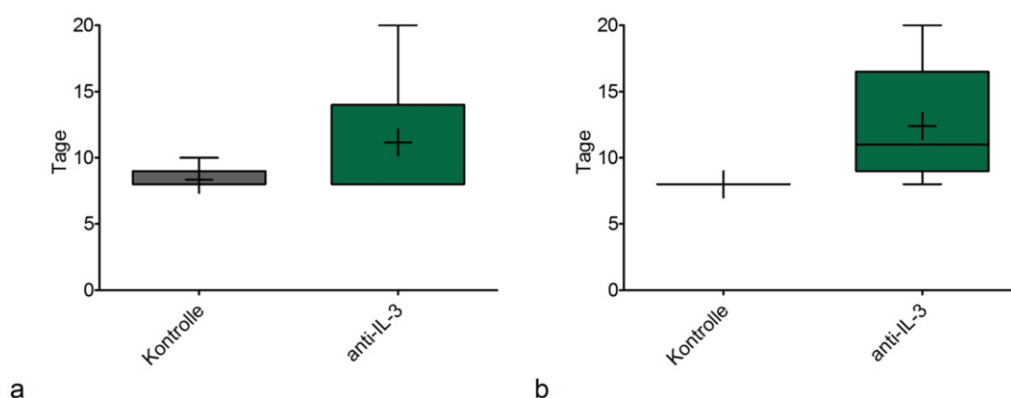


Abbildung 3.9: Symptomfreie Tage vor EAE-Manifestation im anti-IL-3-Versuch: a) mit allen Tieren und b) ohne Tiere mit nicht gelungener EAE-Induktion. Die Boxplots zeigen die 25. und 75. Perzentile, den Median, Mittelwert (+) und Tukey-Whiskers. Tiere ohne Präparat ausgenommen.

- Auswertung unter Berücksichtigung aller Tiere (mit Präparat).
 $MW \pm SD$: $8,4 \pm 0,6$ d (Kontrolle), $11,2 \pm 4,5$ d (anti-IL-3); Median: 8 d (beide);
 ΔMW : 2,8 d; Kein statistisch signifikanter Gruppenunterschied ($p = 0,1302$, zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilten Daten); $n = 14$ (Kontrolle), $n = 13$ (anti-IL-3).
- Darstellung unter Ausschluss der Tiere mit fehlgeschlagener EAE-Induktion.
 $MW \pm SD$: $8,0 \pm 0,0$ d (Kontrolle), $12,4 \pm 4,6$ d (anti-IL-3); Median: 8 d (Kontrolle), Median: 11 d (anti-IL-3); ΔMW : 4,4 d; $n = 6$ (Kontrolle), $n = 5$ (anti-IL-3). Auf eine Signifikanzprüfung wurde verzichtet.

Im **Wiederholungsversuch mit deglykosyliertem anti-IL-3** wurden Scores ab Tag 9 erfasst. Ab diesem Tag traten erste klinische Symptome in allen drei Gruppen auf. In der anti-IL-3-Gruppe blieben ein Tier und in der anti-IL-3 (deglykosyliert)-Gruppe zwei Tiere symptomfrei, entsprechend 7,7% bzw. 13,3%. Auch hier zeigte sich in der Kontrollgruppe der früheste Krankheitsbeginn, Mäuse der mit deglykosyliertem anti-IL-3 behandelten Gruppe erkrankten am spätesten. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte zwar nicht nachgewiesen werden, allerdings ließ sich eine Tendenz ($p = 0,0813$) zu einem späteren Symptombeginn unter der Antikörpertherapie erkennen, vgl. Abbildung 3.10. Auf die Auswertung nur der histologisch Erkrankten wurde aufgrund der geringen Fallzahl (vgl. Tabelle 3.2, S. 48) verzichtet.

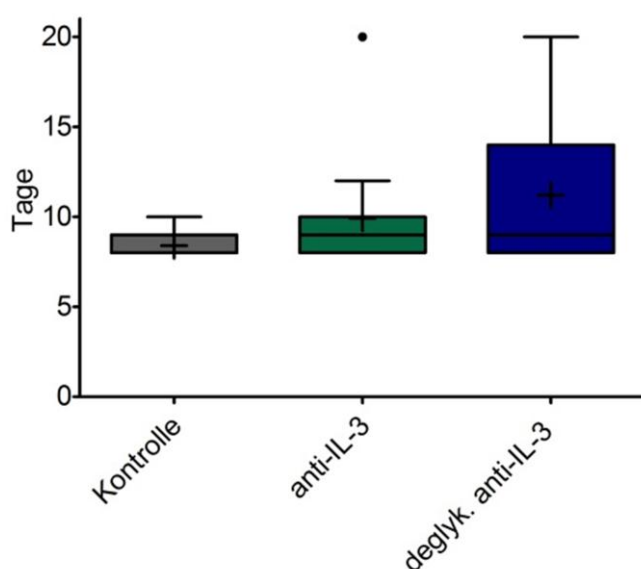


Abbildung 3.10: Symptomfreie Tage vor EAE-Manifestation im anti-IL-3 (deglykosyliert)-Versuch

Die Boxplots zeigen die 25. und 75. Perzentile, den Median, Mittelwert (\oplus), Tukey-Whiskers sowie ausreißerverdächtige Werte (\bullet). Tiere ohne Präparat ausgenommen.
 MW \pm SD: 8,4 \pm 0,6 d (Kontrolle), 9,9 \pm 3,3 d (anti-IL-3), 11,2 \pm 4,2 d (deglyk. anti-IL-3); Median: 8 d (Kontrolle), 9 d (anti-IL-3 und deglyk. anti-IL-3); Δ MW (Kontrolle – anti-IL-3): 1,5 d, Δ MW (Kontrolle – deglyk. anti-IL-3): 2,8 d; Keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede ($p = 0,0813$, Kruskal-Wallis-Test); $n = 15$ (Kontrolle), $n = 13$ (anti-IL-3), $n = 15$ (deglyk. anti-IL-3).

Abbildung 3.11 gibt einen Überblick über die Symptomverläufe der Versuche. Erneut werden hier mehrere Graphen mit und ohne Berücksichtigung der Tiere, die histologisch keine EAE entwickelten, gezeigt. Der dargestellte Symptomverlauf aller kann somit Tiere mit fehlgeschlagener EAE-Induktion beinhalten. Demgegenüber können bei Ausschluss der histologisch Gesunden durch anti-IL-3 oder IgG wirksam therapierte Tiere unterschlagen werden. Für den anti-IL-3 (deglykosyliert)-Versuch ist eine Darstellung nur der Tiere mit histologisch nachgewiesener EAE aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht sinnvoll (s.o.).

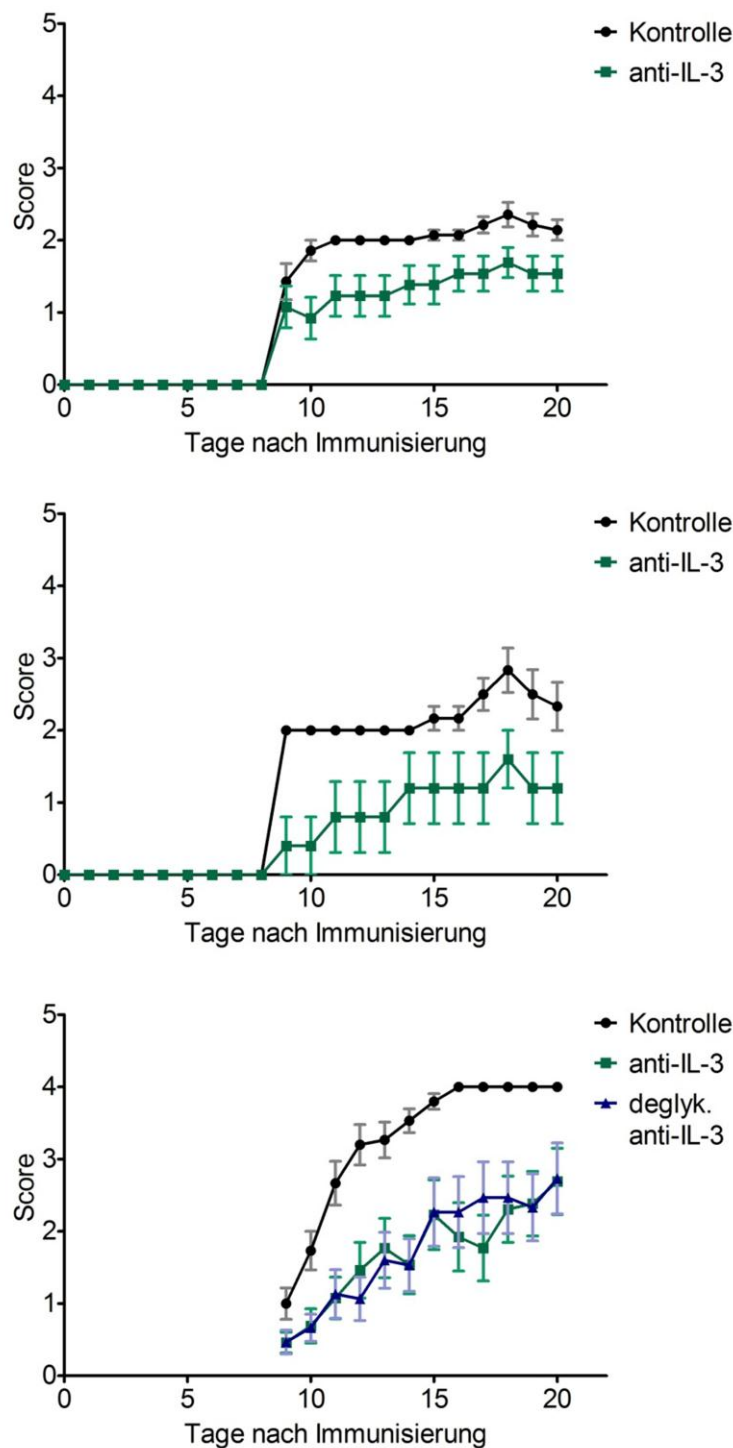


Abbildung 3.11: EAE-Verlauf der anti-IL-3- und Kontrollgruppen

In dem Graphen sind Mittelwert und SEM der Versuchsgruppen dargestellt.

Oben: Anti-IL-3-Versuch: Alle Tiere mit Präparat wurden berücksichtigt: n = 14 (Kontrolle), n = 13 (anti-IL-3).

Mitte: Anti-IL-3-Versuch: Tiere ohne Präparat oder mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen: n = 6 (Kontrolle), n = 5 (anti-IL-3).

Unten: Anti-IL-3 (deglykosyliert)-Versuch: Alle Tiere mit erhaltenem Präparat wurden berücksichtigt: n = 15 (Kontrolle), n = 13 (anti-IL-3), n = 15 (deglyk. anti-IL-3).

Zum Vergleich der Gruppen untereinander kann erneut der kumulative EAE-Score herangezogen werden. Sowohl mit als auch ohne Einbeziehung der Versuchstiere, deren Präparate keine EAE aufzeigen konnten, lässt sich im **anti-IL-3-Versuch** ein signifikant erniedrigter Gesamtscore in der mit anti-IL-3 behandelten Gruppe nachweisen, vgl. Abbildung 3.12. Dies bestätigt sich auch im **anti-IL-3 (deglykosyliert)-Versuch**, bei dem sich ein hoch-signifikanter Gruppenunterschied nachweisen lässt, vgl. Abbildung 3.13.

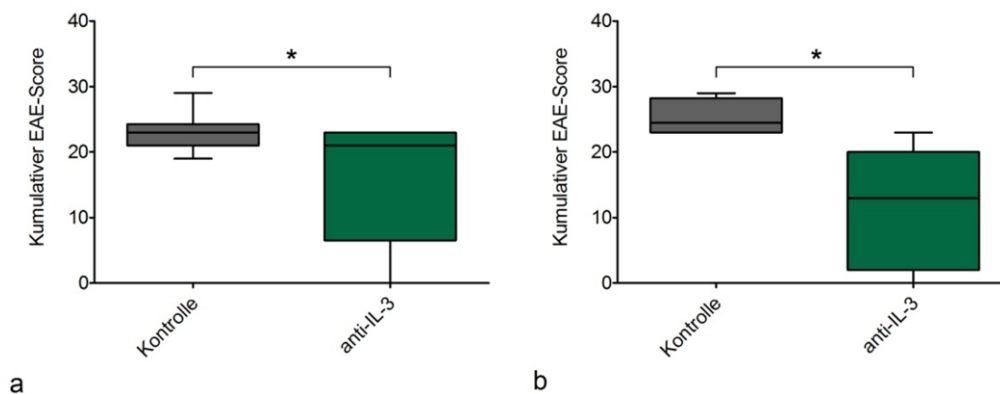


Abbildung 3.12: Vergleich der kumulativen EAE-Scores im anti-IL-3-Versuch
Die Boxplots zeigen die 25. und 75. Perzentile, den Median und Tukey-Whiskers. Tiere ohne Präparat ausgenommen.

- a) Alle Tiere mit Präparat wurden berücksichtigt.
Median: 23,0 (Kontrolle) und 21,0 (anti-IL-3); statistisch signifikanter Gruppenunterschied (* $p = 0,0193$, zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test); $n = 14$ (Kontrolle), $n = 13$ (anti-IL-3).
- b) Tiere mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen.
Median: 24,5 (Kontrolle) und 13,0 (anti-IL-3); statistisch signifikanter Gruppenunterschied (* $p = 0,0129$, zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test); $n = 6$ (Kontrolle), $n = 5$ (anti-IL-3).

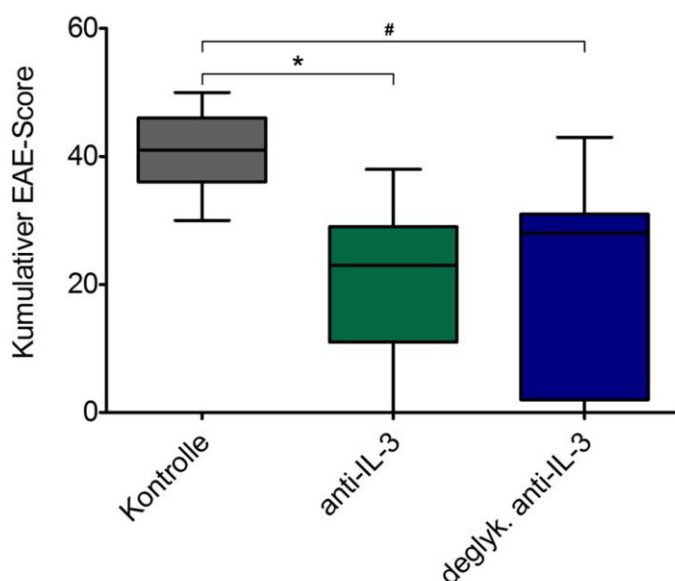


Abbildung 3.13: Vergleich der kumulativen Scores im anti-IL-3 (deglykosyliert)-Wiederholungsversuch

Die Boxplots zeigen die 25. und 75. Perzentile, den Median und Tukey-Whiskers. Tiere mit nicht erhaltenem Präparat ausgenommen. Aufgrund einer niedrigen Fallzahl ist eine Auswertung nur der auch histologisch Betroffenen nicht möglich.

Median: 41,0 (Kontrolle), 23,0 (anti-IL-3), 28,0 (deglyk. anti-IL-3); hochsignifikanter Gruppenunterschied ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis-Test; $*p \leq 0,001$ im Gruppenvergleich der Kontrolle gegen anti-IL-3 und $\#p \leq 0,001$ im Vergleich der Kontrolle gegen deglyk. anti-IL-3, aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Therapiegruppen, Post-hoc-Test nach Dunn); $n = 15$ (Kontrolle), $n = 13$ (anti-IL-3), $n = 15$ (deglyk. anti-IL-3).

3.2.2 Vergleich der Läsionslast

Insgesamt zeigte sich in den Experimenten sowohl in der Behandlungs- als auch in der Kontrollgruppe nur eine geringe EAE-Inzidenz, vgl. Tabelle 3.2.

Tabelle 3.2: EAE-Inzidenz in anti-IL-3- und Kontrollgruppen

Versuch	Gruppe	EAE-Tiere*	Gesamt	Inzidenz [%]
anti-IL-3	anti-IL-3	5	13	38%
	Kontrolle	6	14	43%
anti-IL-3 (kurz)	anti-IL-3	1	10	10%
	Kontrolle	5	10	50%
anti-IL-3 (deglykosyliert)	anti-IL-3 (deglyk.)	1	15	7%
	anti-IL-3	1	13	8%
	Kontrolle	3	15	20%

* Tiere mit einer Läsionslast unter 0,1% wurden als gesund klassifiziert.

Ein Vergleich der Läsionslasten im 21-tägigen **anti-IL-3-Versuch**, nur unter Berücksichtigung der tatsächlich erkrankten Tiere, zeigte einen geringen Unterschied der Mediane (Kontrolle: 1,82%; anti-IL-3: 0,82%), dies allerdings nicht signifikant ($p = 0,5368$, Mann-Whitney-U-Test), vgl. Abbildung 3.14. Wurden alle Tiere einbezogen, ergaben sich aufgrund der zahlreichen Tiere ohne histologische Merkmale einer EAE noch weitaus niedrigere Mediane von 0,05% in der Kontrollgruppe gegenüber 0,01% in der anti-IL-3-Gruppe ($p = 0,5634$, Mann-Whitney-U-Test).

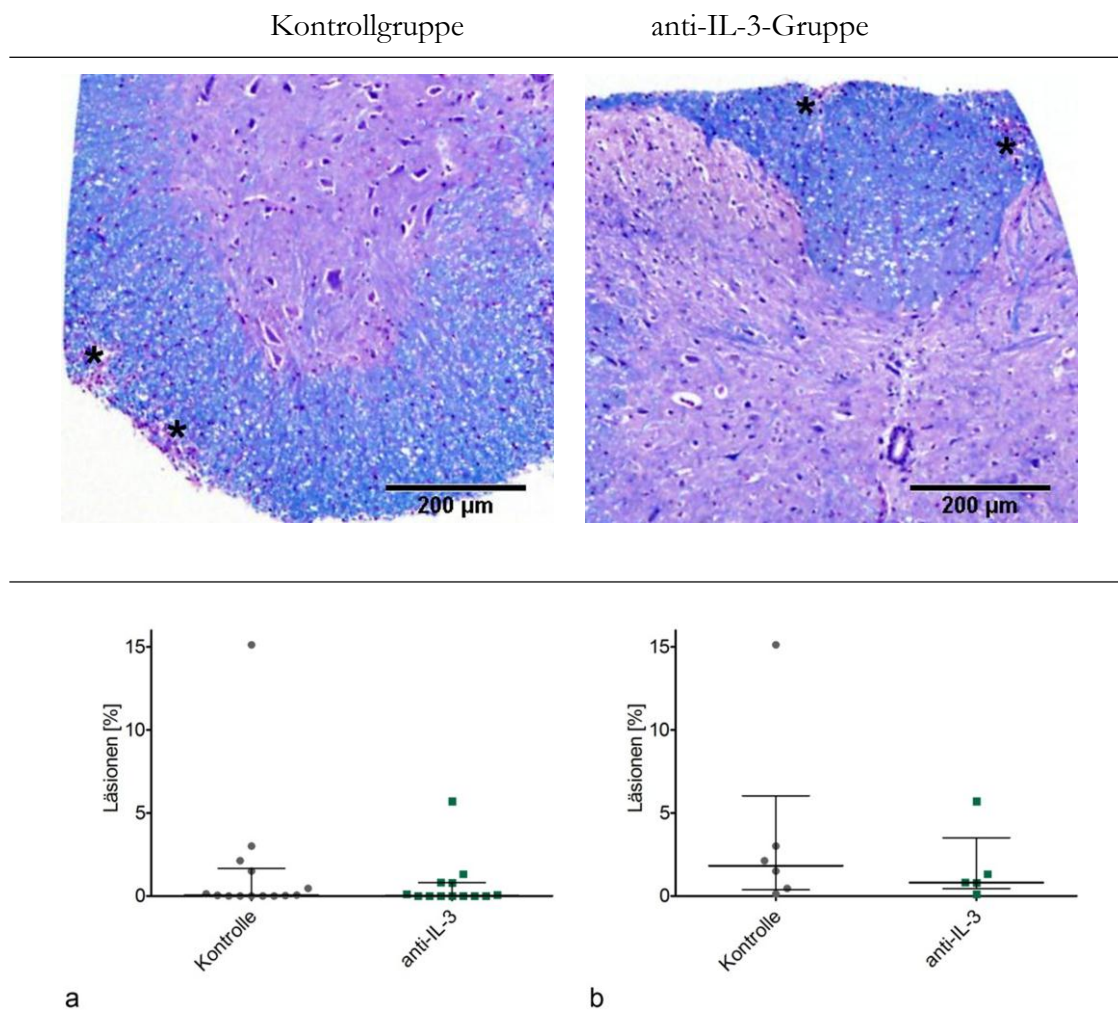


Abbildung 3.14: Läsionslast im anti-IL-3-Versuch

Oben: Exemplarische Übersichtsaufnahmen in der LFB/PAS-Färbung aus Kontroll- und anti-IL-3-Gruppe mit 4x-Objektiv, Messbalken entsprechen 200 μm ; Läsionen mit * gekennzeichnet. Das Beispielbild aus der anti-IL-3-Gruppe zeigt nur sehr kleine entmarkte Areale der weißen Substanz, die nur fraglich als Läsionen zu bewerten sind.

Unten: Läsionslast als prozentualer Anteil der entmarkten Bereiche in Bezug zur Gesamtfläche der weißen Substanz. Die Scatter-Dotplots zeigen den Median sowie den Interquartilsabstand.

- Alle Tiere mit erhaltenem Präparat wurden berücksichtigt.
Median: 0,05% (Kontrolle), 0,01% (anti-IL-3); kein signifikanter Gruppenunterschied ($p = 0,5634$; zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test); $n = 14$ (Kontrolle), $n = 13$ (anti-IL-3).
- Tiere mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen.
Median: 1,82% (Kontrolle), 0,82% (anti-IL-3); kein signifikanter Gruppenunterschied ($p = 0,5368$; zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test); $n = 6$ (Kontrolle), $n = 5$ (anti-IL-3).

Im 11-tägigen **anti-IL-3 (kurz)-Versuch** ließ sich eine noch schwächer ausgeprägte EAE beobachten. In der Kontrollgruppe erkrankten nur 5 Tiere nach histologischen Gesichtspunkten, in der behandelten Gruppe sogar nur eins. Eine statistische Auswertung nur der Erkrankten wurde daher unterlassen. Wurden jedoch alle Präparate berücksichtigt,

ließ sich ein signifikanter Gruppenunterschied nachweisen, vgl. Abbildung 3.15:
Median: 0,09 % (Kontrolle), 0,00 % (anti-IL-3); $p = 0,0205$, Mann-Whitney-U-Test.

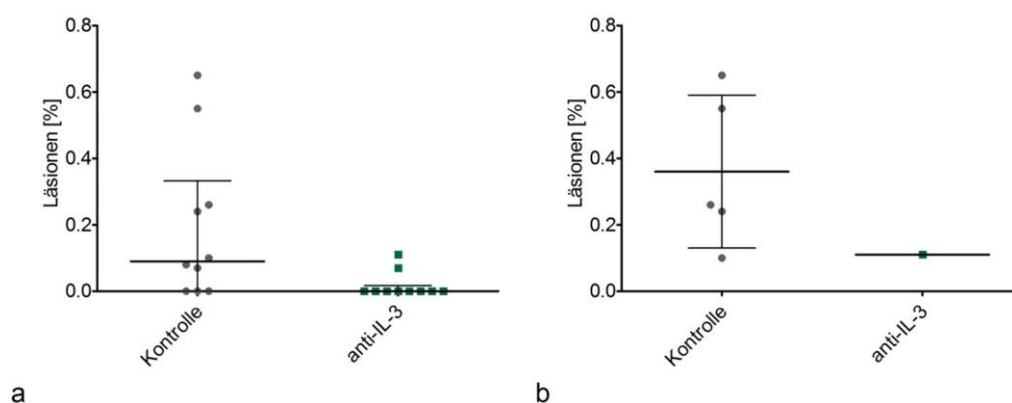


Abbildung 3.15: Läsionslast im 11-tägigen anti-IL-3-Versuch

Läsionslast als prozentualer Anteil der entmarkten Bereiche in Bezug zur Gesamtfläche der weißen Substanz. Die Scatter-Dotplots zeigen den Median sowie den Interquartilsabstand.

a) Alle Präparate wurden berücksichtigt.

Median: 0,09 % (Kontrolle), 0,00 % (anti-IL-3); signifikanter Gruppenunterschied ($p = 0,0205$, zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test); $n = 10$ (beide Gruppen).

b) Tiere mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen.

Median: 0,26 % (Kontrolle), 0,11 % (anti-IL-3); keine statistische Auswertung erfolgt. $n = 5$ (Kontrolle), $n = 1$ (anti-IL-3).

Im **anti-IL-3 (deglykosyliert)**-Wiederholungsversuch konnte allerdings kein relevanter Gruppenunterschied bezüglich der Läsionslast nachgewiesen werden:

Median: 0,00 % (alle drei Gruppen); MW \pm SD: $0,93 \pm 0,22$ % (Kontrolle), $0,32 \pm 1,15$ % (anti-IL-3), $0,35 \pm 1,33$ % (deglyk. anti-IL-3); $p = 0,4834$, Kruskal-Wallis-Test; $n = 15$ (Kontrolle), $n = 13$ (anti-IL-3), $n = 15$ (deglyk. anti-IL-3). Es erfolgte keine Auswertung nur der histologisch betroffenen Tiere (insgesamt nur 5).

Eine Korrelation zwischen Läsionslast und dem kumulativen EAE-Score konnte im **21-tägigen anti-IL-3-Experiment** nicht nachgewiesen werden. Dabei verfehlte der p -Wert unter Berücksichtigung nur der Erkrankten allerdings mit $p = 0,0528$ nur knapp das Signifikanzniveau, Abbildung 3.16 gibt einen Überblick. Wurden alle Präparate einbezogen, ergab sich ein weitaus höherer p -Wert von $p = 0,3937$, bedingt durch zum Teil recht hohe kumulative Scores trotz geringer Läsionslast oder Läsionsfreiheit.

Solche Diskrepanzen – vergleichsweise hohe klinische Scores bei geringer Läsionslast – fielen auch im **anti-IL-3 (deglykosyliert)-Versuch** auf. Hier ließen sich zudem bei einem der insgesamt nur 5 erkrankten Tiere keinerlei Symptome feststellen. Auf eine Korrelationsanalyse (Läsionslast und Kumulativscore) wurde daher für diesen Versuch verzichtet.

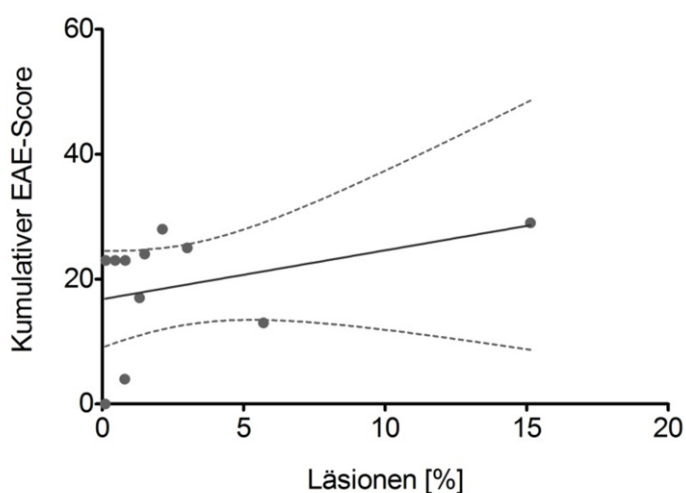


Abbildung 3.16: Kumulativer EAE-Score und Läsionslast im anti-IL-3-Versuch

Dargestellt sind kumulativer EAE-Score und Läsionslast sowie die Regressionsgrade mit 95%-Konfidenzband. Tiere mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen. Die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten erfolgte nach Spearman für ordinal (Score) und metrisch (Läsionslast) skalierte Daten.

$r_s = 0,60$; 95%-CI: $-0,03 - 0,89$; $p = 0,0528$; $n = 11$.

3.2.3 T-Zell-Infiltration

Entgegen der Erwartungen zeigte unter den EAE-Tieren (Läsionslast $\geq 0,1\%$ in der LFB/PAS-Färbung) im 21-tägigen **anti-IL-3-Versuch** die Behandlungsgruppe (MW \pm SD: $9,66 \pm 9,22$ TZ/mm²; Median: $11,5$ TZ/mm²) erhöhte T-Zellzahlen gegenüber der Kontrolle (MW \pm SD: $2,65 \pm 1,76$ TZ/mm²; Median: $2,45$ TZ/mm²). Die Zellzahlen bewegten sich allerdings in beiden Gruppen auf niedrigem Niveau mit hoher Standardabweichung, zudem war der Gruppenunterschied nicht signifikant ($p = 0,5368$, Mann-Whitney-U-Test), vgl. Abbildung 3.17. Unter Einbeziehung aller Tiere ergaben sich noch geringere Unterschiede im Mittelwert und Median, dies mit einem p-Wert von $p = 0,2858$ (Mann-Whitney-U-Test):

MW \pm SD: $4,63 \pm 6,89$ TZ/mm², Median: $1,3$ TZ/mm² (anti-IL-3);
 MW \pm SD: $1,23 \pm 1,72$ TZ/mm², Median: $0,3$ TZ/mm² (Kontrolle).

Aufgrund der noch schwächer ausgeprägten EAE und der noch geringeren T-Zellzahlen pro Querschnitt wurde auf die Auswertung der weiteren Versuche verzichtet.

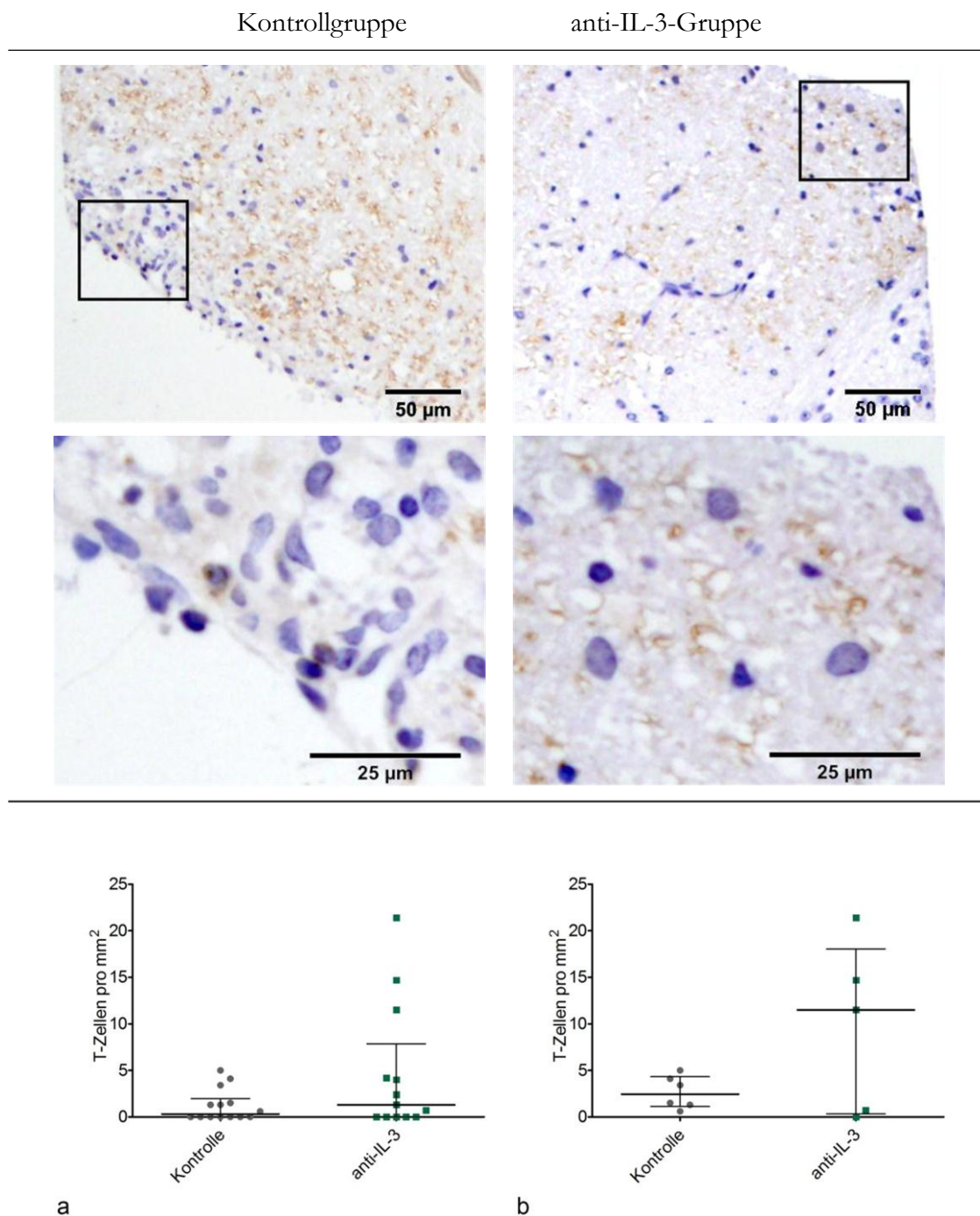


Abbildung 3.17: T-Zell-Infiltration im anti-IL-3-Versuch

Oben: CD3-Färbung korrespondierend mit den LFB/PAS-Schnitten aus Abbildung 3.14, stärkerer vergrößert (10x- und 40x-Objektive, Messbalken oben entsprechen 50 µm, unten 25 µm). Hier in der anti-IL-3-Gruppe in den fraglichen Läsionen kein Nachweis von T-Zellen.

Unten: T-Zell-Infiltration als T-Zellen pro Quadratmillimeter Querschnittsfläche. Scatter-Dotplots zeigen den Median sowie den Interquartilsabstand.

- Alle Präparate wurden berücksichtigt.
Median: 0,3 TZ/mm² (Kontrolle), 1,3 TZ/mm² (anti-IL-3); kein signifikanter Gruppenunterschied ($p = 0,2858$, zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test); $n = 14$ (Kontrolle), $n = 13$ (anti-IL-3).
- Tiere mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen.
Median: 2,45 TZ/mm² (Kontrolle), 11,50 TZ/mm² (anti-IL-3); kein signifikanter Gruppenunterschied ($p = 0,5368$, zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test); $n = 6$ (Kontrolle), $n = 5$ (anti-IL-3).

Unter Berücksichtigung aller erhobenen Daten des **anti-IL-3-Versuches** ergab sich eine positive Korrelation zwischen Läsionslast und T-Zellzahl (Spearman-Korrelationskoeffizient $r_s = 0,55$; 95%-CI: $0,21 - 0,78$; $p = 0,0027$; $n = 27$). Diese Korrelation wurde maßgeblich durch die zahlreichen Wertepaare der Tiere ohne histologisch nachgewiesene EAE-Induktion beeinflusst. Wie Abbildung 3.18 zeigt, konnte hingegen keine Korrelation mehr nachgewiesen werden, wenn diese Tiere ausgenommen wurden (Spearman-Korrelationskoeffizient $r_s = 0,04$; 95%-CI: $-0,59 - 0,64$; $p = 0,9155$; $n = 11$).

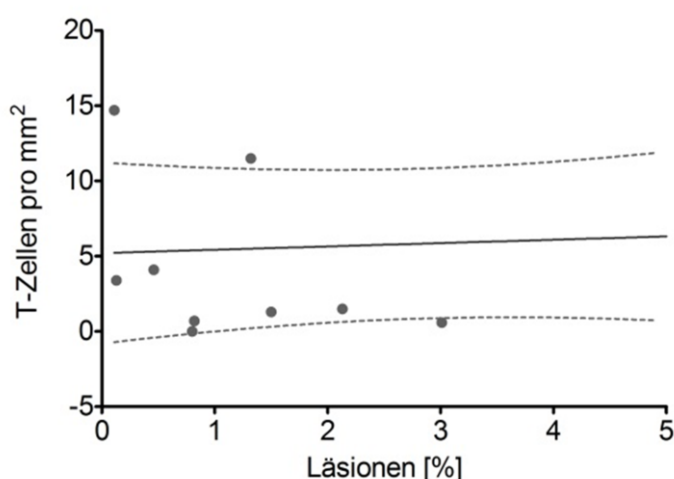


Abbildung 3.18: Läsionslast und T-Zell-Infiltration im anti-IL-3-Versuch
Das Streudiagramm zeigt nur den 21-tägigen anti-IL-3-Versuch. Dargestellt sind Läsionslast und T-Zellen pro Quadratmillimeter Querschnittsfläche sowie die Regressionsgrade mit 95%-Konfidenzband. Zwei Datenpunkte befinden sich außerhalb der Grafik. Tiere mit nicht gelungener EAE-Induktion ausgenommen. Die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten erfolgte nach Spearman.
 $r_s = 0,04$; 95%-CI: $-0,59 - 0,64$; $p = 0,9155$; $n = 11$.

Eine Korrelation zwischen T-Zellzahl und dem kumulativen Score konnte nicht gezeigt werden. Sowohl mit als auch ohne Einschluss der Tiere, die nach dem Kriterium der LFB/PAS-Färbung eine EAE entwickelten, ergab sich zwar entgegen der Erwartung ein negativer Korrelationskoeffizient, dieser war statistisch in beiden Fällen nicht signifikant und durch wenige Extremwerte beeinflusst. In Abbildung 3.19 sind die T-Zell-Infiltration und die kumulativen EAE-Scores in einem Streudiagramm in beiden oben genannten Varianten aufgetragen.

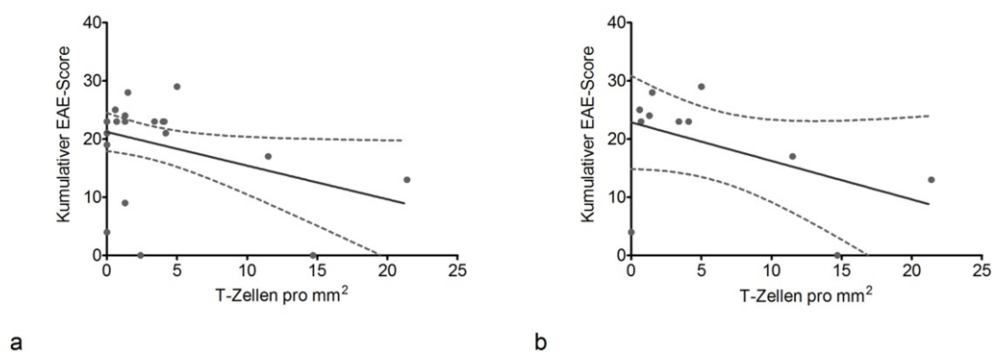


Abbildung 3.19: T-Zell-Infiltration und kumulative Scores im anti-IL-3-Versuch
Die Streudiagramme zeigen den 21-tägigen Versuch. Dargestellt sind T-Zellen pro Quadratmillimeter Querschnittsfläche und die kumulativen EAE-Scores sowie die Regressionsgraden mit 95 %-Konfidenzbändern.

Die Ermittlung der Korrelationskoeffizienten erfolgte nach Spearman.

- a) Alle Präparate berücksichtigt.
 $r_s = -0,11$; 95 %-CI: $-0,48 - 0,30$; $p = 0,5989$; $n = 27$.
- b) Tiere ohne histologischen Nachweis einer EAE ausgenommen.
 $r_s = -0,29$; 95 %-CI: $-0,76 - 0,40$; $p = 0,3863$; $n = 11$.

4 Diskussion

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis ist eine meist durch Myelinbestandteile künstlich induzierte demyelinisierende Erkrankung des ZNS, die mit einer durch T-Helferzellen vermittelten, ausgeprägten T-Zell- und Monozyteninfiltration einhergeht (Robinson et al. 2014). Trotz zahlreicher Unterschiede zwischen der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis und der multiplen Sklerose gelten die vielen heute verwendeten Subtypen der EAE noch immer als äußerst nützliches Modell zur Untersuchung einzelner Aspekte der MS (Procaccini et al. 2015).

Das ursprünglich als Kolonie-stimulierender Faktor eingeordnete Interleukin-3 wurde bald als pluripotentes immunregulatorisches Zytokin bewertet und gilt heute als wichtiger Mediator physiologischer, aber auch pathologischer Prozesse im ZNS (Frendl 1992, Sugita et al. 1999). Wie das strukturell und funktionell eng verwandte GM-CSF und IL-5 gehört es zu einer 4- α -Helices-Zytokingruppe (Feng et al. 1996). Die Rezeptoren der drei Botenstoffe teilen sich die gemeinsame Rezeptoruntereinheit βc und werden daher als GM-CSF/IL-3/IL-5-Rezeptorfamilie zusammengefasst (Goodall et al. 1993). Für GM-CSF wird heute eine wichtige Rolle in der Induktion der EAE angenommen und eine Beteiligung an der Pathogenese der multiplen Sklerose vermutet (McQualter et al. 2001, Ponomarev et al. 2006, El-Behi et al. 2011, Rasouli et al. 2015). Im Gegensatz dazu ist wenig über die Bedeutung von Interleukin-3 für neuroinflammatorische Erkrankungen bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von rekombinantem murinen Interleukin-3 sowie anti-IL-3-Antikörpern auf die Läsionslast einer durch MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE in C57BL/6 (H-2^b)-Mäusen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass intraperitoneal verabreichtes IL-3 die EAE deutlich verstärken kann. Die Therapie mit anti-IL-3-Antikörpern scheint zwar klinisch den Verlauf zu verbessern, histologisch war jedoch kein wesentlicher Erfolg nachweisbar. Somit erlauben die experimentellen Ergebnisse keine klaren Schlüsse über die Effektivität einer Therapie mit anti-IL-3-Antikörpern.

4.1 Wandel im Verständnis der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis

Lange galten CD4⁺-T_H1-Zellen als hauptverantwortlich für die Entstehung der EAE. Dies wurde u.a. mit dem hohen Anteil von T-Helferzellen, vor allem vom T_H1-Typ, in EAE-Läsionen sowie der Möglichkeit, durch adoptiven Transfer autoreaktiver, Interferon- γ -produzierender T_H1-Zellen eine EAE zu induzieren, begründet (Sriram et al. 1982, Merrill et al. 1992, Segal und Shevach 1996). Zudem führte in Mäusen eine Defizienz des für die T_H1-Zellentwicklung wichtigen Transkriptionsfaktors T-bet zu einer Resistenz gegenüber der EAE-Induktion (Bettelli et al. 2004). Antiinflammatorische, protektive Effekte wurden

vor allem den T_H2-Zellen zugesprochen (van der Veen und Stohlman 1993, Falcone und Bloom 1997, Cua et al. 1995).

Überraschenderweise zeigten Gendelektionsstudien eine Unabhängigkeit der EAE-Induktion sowohl von dem T_H1-Zellen-induzierenden Zytokin IL-12 als auch von den von T_H1-Zellen produzierten Botenstoffen, wie IFN- γ . Stattdessen schien im ZNS das neu entdeckte Interleukin-23 maßgeblich für die T-Zell-Pathogenität verantwortlich (Becher et al. 2003). Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Interleukin die Entwicklung von T-Helferzellen zu äußerst enzephalitogenen T_H17-Zellen fördern kann (Langrish et al. 2005). Diese T_H17-Zellen koexprimieren neben dem stark proinflammatorischen IL-17 u.a. das synergistisch wirkende IL-22 und sind vermutlich in zahlreiche Autoimmunerkrankungen involviert (Aggarwal et al. 2003, Liang et al. 2006). Sowohl T_H1- als auch T_H17-Zellen sind in den entzündlichen MS- und EAE-Läsionen zu finden. Die T_H17-Lymphozyten können durch Verletzung der Blut-Hirn-Schranke die Rekrutierung anderer CD4⁺-Lymphozyten erleichtern und zudem direkt Neurone abtöten (Kebir et al. 2007). Während IL-6 und TGF- β (*transforming growth factor-beta*) für die Differenzierung der T-Zellen zu T_H17-Zellen verantwortlich gemacht werden, entfalten diese vermutlich erst unter Einfluss von IL-23 ihre Pathogenität (McGeachy et al. 2007). Die Zellen zeigen eine hohe Plastizität und können so womöglich auch einen eher regulatorischen, remodulierenden Phänotyp annehmen (Sie et al. 2014). Obwohl zahlreiche Hinweise auf ein breites Spektrum neurotoxischer und proinflammatorischer Wirkungen von IL-17 bestehen, wurde in mehreren Studien belegt, dass das Zytokin für die Ausbildung einer EAE verzichtbar ist (Sie et al. 2014).

Die proinflammatorische Wirkung der T_H17-Zellen scheint also durch andere Faktoren vermittelt. Bereits vor Entdeckung dieser neuen Zelllinie war bekannt, dass GM-CSF unverzichtbar für die EAE-Induktion ist (McQualter et al. 2001). Wenngleich dieses Zytokin von vielen Zellen produziert wird, scheint nur die GM-CSF-Produktion autoreaktiver T-Zellen für die mikrogliale Aktivierung und die Ausbildung einer EAE nötig (Ponomarev et al. 2006). GM-CSF wurde eine entscheidende Bedeutung für die Enzephalitogenität sowohl der T_H1- als auch der T_H17-Zellen zugesprochen. Da jedoch angenommen wurde, dass die autoreaktiven T_H1-Zellen letztendlich aus T_H17-Zellen hervorgehen würden, wurde die „IL-23-T_H17-GM-CSF-Achse“ hauptverantwortlich für die Pathogenese entzündlicher ZNS-Erkrankungen gemacht (El-Behi et al. 2011). Doch so, wie das T_H1-T_H2-Paradigma durch die entdeckten T_H17-Zellen überholt wurde, war zu erwarten, dass auch die T_H17-Hypothese Modifikationen erfährt (Steinman 2007). So wurde inzwischen eine antagonistische Regulation der IL-17- und GM-CSF-Expression beobachtet und eine neue, vornehmlich GM-CSF-produzierende T-Helferzellpopulation beschrieben, die sich unter Einfluss von IL-7 entwickelt (Noster et al. 2014, Sheng et al. 2014). Einen Überblick über aktuell diskutierte Helferzell-Subpopulationen gibt Abbildung 4.1.

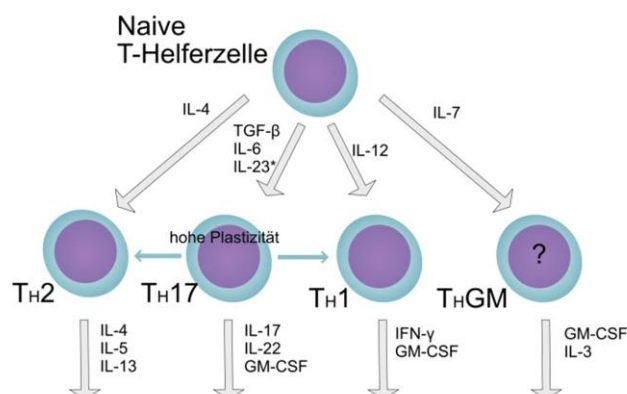


Abbildung 4.1: T-Helferzell-Subpopulationen

Vereinfachtes Modell. Eine neue Subpopulation, die T_H GM-Zellen, wird diskutiert. T_H 17-Zellen zeigen eine hohe Plastizität und können sowohl gewebsschädigende als auch protektive Phänotypen annehmen.

* IL-23 ist vor allem für die Entwicklung zu enzephalitogenen Helferzellen von Bedeutung.

(eigene Grafik in Anlehnung an Herndler-Brandstetter und Flavell 2014 sowie Abbas et al. 2014)

Innerhalb der GM-CSF/IL-3/IL-5-Familie bestehen komplizierte Wechselwirkungen und überlappende Funktionen. Die Zytokine können gegenseitig Bindungen an den Rezeptor verhindern oder die Rezeptordichte auf Zelloberflächen beeinflussen (Lopez et al. 1992, Gregory et al. 2003). So kann die IL-3-Rezeptorexpression durch alle Zytokine der Familie hochreguliert werden (Gregory et al. 2003). Angesichts dieser gegenseitigen Beeinflussung und der funktionellen Ähnlichkeiten der Zytokine scheint die Bedeutung von Interleukin-3 für die Entstehung oder Unterhaltung entzündlicher Erkrankungen des ZNS, insbesondere der MS und des Tiermodells EAE, von großem Interesse. Bezeichnenderweise konnte von Sheng et al. erst kürzlich gezeigt werden, dass die neu entdeckten T_H GM-Zellen im hohen Maße auch Interleukin-3 exprimieren, sodass tatsächlich eine Beteiligung des Zytokins an neuroinflammatorischen Prozessen zu vermuten ist (Sheng et al. 2014).

4.2 Die Bedeutung von Interleukin-3 im ZNS

Innerhalb des ZNS besteht, z. B. von Astrozyten und Mikroglia, die Kapazität Interleukin-3 zu bilden (Gebicke-Haerter et al. 1994, Sugita et al. 1999). Dabei hat IL-3 wie GM-CSF eine stark aktivierende und mitogene Wirkung auf mononukleäre Phagozyten im Gehirn und kann so als Mediator inflammatorischer Reaktionen fungieren (Giulian und Ingeman 1988, Frei et al. 1986, Htain et al. 1998). Andererseits sind auch wachstumsfördernde Effekte auf zentrale cholinerge Neurone beschrieben (Kamegai et al. 1990). Neben den genannten Zytokinen können jedoch zahlreiche weitere sowohl pro- als auch

antiinflammatorische und sogar hämatopoetische Zytokine im ZNS gebildet werden. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass das zentrale Nervensystem vermutlich ähnlich dem peripheren Immunsystem mit einem fein abgestimmten Zytokinnetzwerk ausgestattet ist, das adäquate Abwehrantworten innerhalb dieses Systems erlaubt. Andererseits können unter bestimmten pathologischen Umständen lokal oder zeitlich begrenzte Dysregulationen auftreten, die schließlich zu neurologischen Störungen beitragen (Campbell 1998).

Anhand verschiedener Modelle mit transgenen Mäusen konnte eine dysregulierte IL-3-Expression im ZNS erzeugt werden. Diese Tiere entwickelten ausgeprägte neurologische Störungen, einhergehend mit schweren histopathologischen Veränderungen. Chiang et al. zeigten, dass hohe intrazerebrale IL-3-Spiegel zu einer letalen, früh einsetzenden Neuroinflammation führten, während niedrigere Spiegel eine eher chronisch progressive Erkrankung hervorriefen, die histopathologisch einige Ähnlichkeiten mit EAE-Läsionen und MS-Plaques hatte (Chiang et al. 1996). Vergleichbare Läsionen konnten bei Tieren mit peripherem IL-3-Mangel und zentraler Überexpression gezeigt werden (Sugita et al. 1999). Dagegen fanden Chavany et al. bei Mäusen mit generalisierter IL-3-Überexpression vor allem eine starke autoimmune Reaktion gegen Motoneurone des Rückenmarks (Chavany et al. 1998). Demnach können erhöhte Interleukin-3-Spiegel innerhalb des komplexen Zytokinnetzwerkes im zentralen Nervensystem sowohl in Abhängigkeit von der Dosis als auch von den Begleitfaktoren zu verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern beitragen.

Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurde Einfluss auf gleich mehrere Faktoren genommen: Zum einen wurde bei allen Tieren mit der Induktion der EAE durch MOG-Peptid und Adjuvans eine heftige immunologische Reaktion im ZNS hervorgerufen, die sich in Form einer EAE manifestierte. Zum anderen wurde entweder durch die intraperitoneale IL-3-Applikation ab Tag 5 oder Antikörpergabe ab Tag 0 nach Immunisierung der periphere IL-3-Spiegel manipuliert. Durch dieses Vorgehen sollte geklärt werden, inwieweit peripher hohe IL-3-Konzentrationen überhaupt Einfluss auf zentralnervöse, entzündliche Prozesse nehmen können. Die IL-3-Blockade diente ergänzend der Untersuchung, ob das Interleukin einen entscheidenden Anteil an der Läsionsbildung hat oder hierfür verzichtbar ist. Letztendlich sollten damit Hinweise gefunden werden, ob die periphere Blockade eine therapeutische Möglichkeit zur Behandlung neuroinflammatorischer Erkrankungen, insbesondere der MS, darstellt.

4.3 Interleukin-3 kann die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis verstärken

Interleukin-3 kann in Kultur die Enzephalitogenität MBP-spezifischer, autoreaktiver T-Zellen aus SJL/J (H-2^b)-Mäusen erhöhen (Zhao et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von IL-3 in vivo auf eine MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE in

C57BL/6 (H-2^b)-Mäusen untersucht. Dieses EAE-Modell bietet eine gute und etablierte Möglichkeit, autoimmunologische Prozesse im ZNS zu untersuchen (Mendel et al. 1995, Rangachari und Kuchroo 2013).

In den hier ausgewerteten Experimenten wurde durch i.p.-IL-3 (ab Tag 5) der Zeitpunkt des Auftretens erster klinischer Manifestation der EAE nicht beeinflusst. Allerdings waren die Tiere der Behandlungs- gegenüber der Kontrollgruppe im Verlauf wesentlich stärker betroffen, wie der signifikant höhere kumulative EAE-Score zeigt.

Nach histologischen Kriterien entwickelten in der IL-3-Gruppe geringfügig mehr Tiere eine EAE als in der Kontrollgruppe (93% in der IL-3-Gruppe gegenüber 83% in der Kontrollgruppe). Insgesamt schlug allerdings nur bei zwei Tieren der Kontrollgruppe und einer mit IL-3 behandelten Maus die EAE-Induktion fehl, sodass sich hieraus kaum Schlüsse bezüglich eines IL-3-Effektes ziehen lassen. Von größerer Bedeutung ist jedoch die in der LFB/PAS-Färbung nachgewiesene hoch-signifikante Zunahme der Läsionslast in der IL-3-Gruppe um ca. 7 Prozentpunkte, was etwa einer Verdoppelung der durchschnittlich betroffenen Fläche der weißen Substanz entspricht.

Die Läsionslast korrelierte mit dem Kumulativ-Score sowie der Anzahl von CD3⁺-Zellen pro Quadratmillimeter im gesamten Rückenmarksquerschnitt. Für die CD3⁺-Zellen konnte zwar ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung in der IL-3-Gruppe nachgewiesen werden, diese allerdings nicht signifikant ($p = 0,1074$). Auch eine signifikante Korrelation zwischen T-Zellzahl und Score bestand nicht. Zu beachten ist hier allerdings, dass jeweils nur der am stärksten betroffene Querschnitt eines Präparates bezüglich der CD3⁺-Zellen untersucht wurde und nicht alle Schnitte gleichermaßen ausgewertet wurden. Zudem wurde die Zellinfiltration des gesamten Querschnitts erfasst, sodass auch ein diffuser, nicht auf Läsionen beschränkter Zelleinstrom in das Rückenmark in die Auswertung miteinflusst. Dieses Verfahren ist somit ungenauer und fehleranfälliger als die Auswertung der LFB/PAS-Präparate, kann aber dennoch als sekundäres Kriterium bei der Gesamtinterpretation helfen.

Insgesamt deuten die hier erhobenen Ergebnisse auf ein starkes Potenzial von IL-3 hin, eine EAE sowohl nach klinischen als auch nach histologischen Gesichtspunkten zu verstärken. Peripher erhöhte IL-3-Spiegel vermögen demnach in der Ausnahmesituation eines starken, autoimmun-neuroinflammatorischen Prozesses eine proinflammatorische Wirkung zu erzielen. Insbesondere die ausgeprägte Zunahme der Läsionslast kann hier als starkes Kriterium angeführt werden. Die – wenn auch nicht signifikante – Erhöhung der T-Zellanzahl in der IL-3-Gruppe, die positiv mit der Läsionslast korreliert, weist ebenfalls in diese Richtung.

Der Pathomechanismus, durch den IL-3 diesen Effekt erzielt, kann hiermit allerdings nicht aufgedeckt werden. Die schon beschriebenen tierexperimentellen Untersuchungen, in deren Rahmen sich MS- und EAE-ähnliche Läsionen der weißen Substanz durch eine IL-3-

Überexpression im ZNS nachweisen ließen, können dafür vergleichend herangezogen werden (Chiang et al. 1996, Powell et al. 1999). Dem Interleukin wurde hier u.a. auch ein permeabilitätserhöhender Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranke zugesprochen, wodurch das Einwandern weiterer Entzündungszellen, v.a. von Makrophagen und Mastzellen, erleichtert werden könnte (Powell et al. 1999). Vermutlich besitzt IL-3 zudem Leukozyten-Endothel-Adhäsions- und Diapedese-fördernde Eigenschaften (Brizzi et al. 1993, Lampinen et al. 2004). So könnte auch in dem hier durchgeführten Versuch das i.p.-verabreichte IL-3 die Migration von Entzündungszellen in das ZNS erleichtert haben.

Durch seine Wirkung als hochpotenter hämatopoetischer Wachstumsfaktor, vor allem im Rahmen immunologischer Reaktionen, könnte das Zytokin zudem die Zahl der inflammatorischen Zellen erheblich erhöht haben. Aus einer aktuellen Studie zur Sepsisforschung geht hervor, dass IL-3 so als starker Aktivator einer „Notfall-Myelopoese“ einen Zytokinsturm indirekt – durch die vermehrte Bildung Zytokin-produzierender Zellen – auszulösen vermag, wodurch wiederum Entzündungsreaktionen amplifiziert werden (Weber et al. 2015).

Die Entdeckung der GM-CSF- und IL-3-sezernierenden T-Helferzellen als für die EAE-Induktion wichtige Zellpopulation lässt neben den eher unspezifischen Effekten auf die Hämatopoese eine direkte lokale Wirkung des Interleukins in den Läsionen vermuten (Sheng et al. 2014). Hierbei könnte die Fähigkeit Makrophagen bzw. Mikroglia zu aktivieren und die Antigenpräsentationskapazität zu regulieren von Bedeutung sein (Frendl 1992). Mikroglia ist dann selbst in der Lage, IL-3 zu exprimieren und damit autokrin das eigene Wachstum zu fördern. Gebicke-Haerter et al. (1994) interpretierten eine lokale mikrogliale IL-3-Expression als ein Frühzeichen entzündlicher Prozesse im Gehirn, dem eine Produktion zahlreicher anderer Zytokine und die Rekrutierung immunkompetenter Zellen in die Läsionen folgen.

Insgesamt lässt sich demnach spekulieren, dass Interleukin-3 sowohl durch lokale als auch periphere Effekte die Bildung weiterer proinflammatorischer Zytokine zu orchestrieren, die Myelopoese zu steigern und die Rekrutierung weitere Entzündungszellen in die Läsionen zu erleichtern vermag und damit letztendlich zu einer Aggravation der Neuroinflammation beiträgt. Mögliche IL-3-Effekte sind in Abbildung 4.2 zusammengefasst.

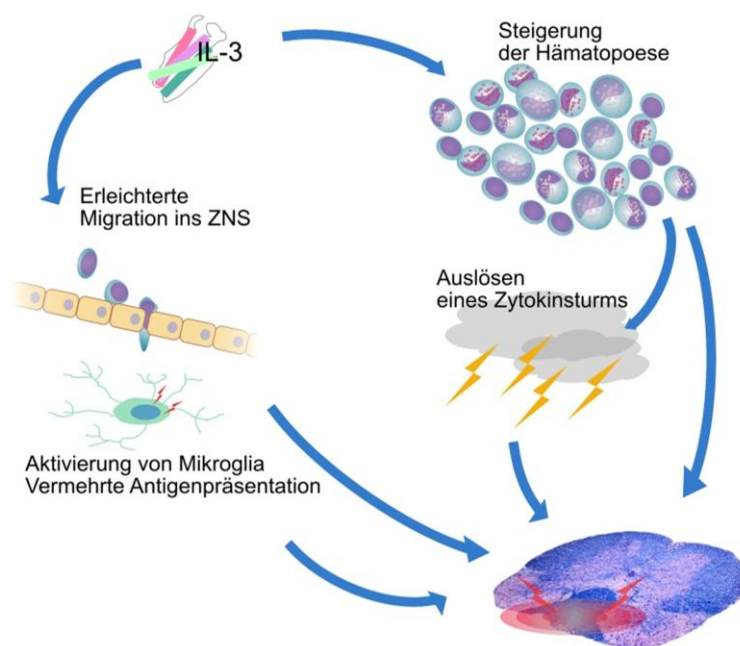


Abbildung 4.2: Mögliche IL-3-Effekte auf die EAE (eigene Grafik)

4.4 Der Einfluss des anti-IL-3-Antikörpers auf die EAE-Induktion erfordert weitere Untersuchungen

Weniger eindeutig sind die Ergebnisse der frühen IL-3-Blockade durch anti-IL-3-Antikörper bzw. deglykosylierte anti-IL-3-Antikörper. Insgesamt entwickelte weit weniger als die Hälfte aller Tiere in den Versuchen überhaupt eine EAE.

Sowohl in den Behandlungs- als auch in den Kontrollgruppen traten jeweils ab Tag 9 erste Symptome der EAE auf. Tendenziell schienen die Tiere der Kontrollgruppen etwas früher zu erkranken, dies aber nicht signifikant. Der kumulative Score der behandelten Tiere war dann allerdings signifikant erniedrigt gegenüber der Kontrollgruppe, unabhängig davon, ob den Tieren deglykosylierter oder nicht vorbehandelter anti-IL-3-Antikörper verabreicht wurde.

In allen drei Versuchen konnte in der histologischen Begutachtung nur eine äußerst geringe Läsionslast beobachtet werden, diese zudem innerhalb der einzelnen Versuche ohne relevante Gruppenunterschiede. Die ergänzend in dem längeren anti-IL-3-Versuch durchgeführte Auswertung der CD3⁺-Zellen dokumentierte ebenfalls sehr niedrige, nicht signifikant divergierende Werte.

Unklar ist, warum sich in diesen Experimenten die EAE so schlecht induzieren ließ, zumal sich das Immunisierungs-Protokoll nicht von dem unterschied, mit dem eine gut ausgeprägte EAE im IL-3-Versuch erzielt werden konnte. Eine mögliche Ursache könnte

in der parallel zur Immunisierung der Behandlungsgruppe täglichen i. p.-Verabreichung von IgG aus Rattenserum in den Kontrollen gesucht werden. Die unspezifischen, gegen keine bekannten Antigene gerichteten Immunglobuline wurden, in Analogie zum anti-IL-3-Antikörper, ab dem Tag der Immunisierung bis Versuchsende verabreicht. Angesichts der auch in den Kontrollgruppen nur geringen EAE-Ausbildung scheint auch denkbar, dass die eigentlich als Kontrolle gedachten Immunglobuline selbst einen hemmenden Einfluss auf die EAE-Induktion gehabt haben könnten. Vergleichend seien hier die EAE-protectiven Effekte von humanen, intravenös verabreichten Immunglobuline (IVIg) aus gepooltem Plasma gesunder Spender erwähnt, die vermutlich über eine Induktion regulatorischer T-Zellen durch natürliche Killerzellen vermittelt werden (Achiron et al. 1994b, Achiron et al. 1994a, Ephrem et al. 2008, Chong et al. 2013). Obwohl sogar durch intraperitoneale Applikation von IVIg in C57BL/6J-Mäusen eine EAE verhindert werden kann, spricht gegen einen derartigen Einfluss auch von Ratten-IgG, dass in ähnlichen Versuchen durchaus in den mit den Kontroll-Immunglobulinen aus Ratten behandelten Mäusen eine EAE induziert werden konnte (Ephrem et al. 2008, Serada et al. 2008). Ohne eine nicht mit Immunglobulinen behandelte Referenzgruppe bleibt letztlich ungewiss, inwieweit in den verschiedenen Versuchen mit anti-IL-3-Antikörpern die Ergebnisse in der Kontrollgruppe durch IgG beeinflusst wurden. Sollte jedoch tatsächlich ein IgG-Effekt vorliegen, würde ein Vergleich der mit anti-IL-3-Antikörpern behandelten Versuchstiere mit der Kontrollgruppe keine Schlussfolgerung über die Effektivität der anti-IL-3-Therapie erlauben, sondern lediglich zwei Therapiealternativen gegenüberstellen.

Sollten die Ergebnisse des Experimentes allerdings nicht durch das in der Kontrollgruppe verabreichte IgG beeinflusst sein, wäre der Grund für die mäßige EAE-Induktion weiter unklar. Folglich müsste dann ein unbeabsichtigtes Abweichen vom Induktionsprotokoll diskutiert werden. Hiergegen spricht jedoch, dass alle drei Versuche eine nur schwach ausgeprägte EAE zeigen. Werden die Ergebnisse dennoch unter dieser Annahme analysiert, ist der oben beschriebene fehlende signifikante Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe nicht überraschend: Eine derart schwach ausgeprägte EAE hätte auch einen sehr kleinen Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe zur Folge, der zudem statistisch mit einer ethisch vertretbaren Anzahl an Versuchstieren nur äußerst schwer nachzuweisen wäre.

Abseits dieses statistischen Effektes hätten selbstverständlich auch andere Faktoren zu ähnlichen Läsionslasten oder T-Zellzahlen in beiden Versuchsgruppen führen können. Die wohl einfachste Erklärung wäre, dass eine periphere IL-3-Blockade keinen positiven Einfluss auf zentralnervöse inflammatorische Prozesse hätte. Sugita et al. zeigten 1999 sogar mithilfe transgener Mäuse, dass eine periphere IL-3-Depletion durch unbekannte Mechanismen zu einer zentralnervösen Überexpression des Zytokins und schweren neurologischen Defiziten führen kann. Dabei beobachtete die Arbeitsgruppe plaqueartige Läsionen und Demyelinisierung vor allem in Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark. Auch wenn in der vorliegenden Arbeit eine zentrale IL-3-Überexpression angesichts der

wenigen Läsionen unwahrscheinlich erscheint, da in der Behandlungsgruppe dann größere ZNS-Schädigungen zu erwarten wären, verdeutlichen die Ergebnisse von Sugita et al. doch eindrücklich die Komplexität des Zytokinnetzwerkes und demonstrieren, welche unerwarteten Folgen ein Eingriff in dasselbe durch eine periphere IL-3-Depletion hervorrufen kann. Daher widerlegt aber auch ein Ausbleiben eines therapeutischen Effektes durch die periphere anti-IL-3-Applikation nicht zwangsläufig eine Beteiligung von IL-3 in der Pathogenese der EAE oder anderer neuroinflammatorischer Erkrankungen.

Ein weiterer möglicher Grund für die Ineffektivität einer IL-3-Blockade könnte in den komplizierten Wechselwirkungen der Rezeptoren der GM-CSF/IL-3/IL-5-Familie liegen. Für Zellen, wie Monozyten und eosinophile und basophile Granulozyten, die Rezeptoren für mehr als eins der Zytokine besitzen, wurde eine Konkurrenz an der gemeinsamen β c-Rezeptoruntereinheit beobachtet. So kann z.B. an Eosinophilen die Bindung von IL-3 durch GM-CSF verhindert werden. Eine solche kompetitive Bindung kann vermutlich eine exzessive Stimulation durch die drei in ihrer Funktion ähnlichen Zytokine mit potenziell schädlicher Wirkung für den Organismus limitieren (Lopez et al. 1992). Hierzu passend ist auch die Beobachtung, dass sich die adhäsionsfördernde Wirkung von IL-3 und GM-CSF auf Monozyten bei gleichzeitiger Verabreichung beider gegenüber einer Monotherapie mit einem der Zytokine nicht wesentlich verstärkt (Elliott et al. 1990). Umgekehrt konnte an einem Tiermodell der zerebralen Malaria gezeigt werden, dass durch Antikörper gegen nur einen der extrazellulären Botenstoffe keine entzündungshemmende Wirkung erzielt werden konnte, wohingegen eine duale Therapie deutlich protektiv wirkte (Grau et al. 1989). Folglich könnte auch im Falle der EAE eine auf IL-3 und GM-CSF gleichzeitig abzielende Therapie deutlich effektiver sein.

Neben einer kompetitiven Hemmung am Rezeptor scheinen die Zytokine aber ihre Wirkung auch durch eine Modulation der Rezeptorexpression gegenseitig beeinflussen zu können. Eine solche wurde von Walker et al. schon 1985 vermutet, nachdem eine verminderte GM-CSF-Bindung an Knochenmarkszellen nach Kultivierung in IL-3 beobachtet worden war (Walker et al. 1985). Heute ist bekannt, dass die Expression der α -Rezeptoruntereinheiten zum Teil auch durch die jeweils nicht spezifischen Zytokine der GM-CSF/IL-3/IL-5-Familie moduliert werden kann. Diese Erkenntnisse beziehen sich allerdings im Wesentlichen auf humane eosinophile Granulozyten, an denen exemplarisch gezeigt werden konnte, dass alle drei Zytokine die hIL-3R α -Expression hochregulieren können, wohingegen der GM-CSF-Rezeptor nicht durch IL-3 oder IL-5 reguliert werden konnte (Gregory et al. 2003, Yoshimura-Uchiyama et al. 2003). Anhand des IL-5-Rezeptors konnte aber gezeigt werden, dass ein solcher Zusammenhang nicht statisch sein muss: Die Expression dieses Rezeptors auf humanen Eosinophilen reagiert beispielsweise in Abhängigkeit vom Reifestadium der Zelle auf einen IL-5-Stimulus sehr unterschiedlich (Gregory et al. 2003). Das Mausmodell wird weiter durch die zusätzliche, IL-3-spezifische murine β_{IL-3} -Rezeptoruntereinheit verkompliziert (Carr et al. 2014). Wie also IL-3 und GM-CSF gegenseitig ihre Rezeptorexpression auf verschiedenen Zellpopulationen und

Reifestadien beeinflussen, bleibt schwer abzuschätzen. Sollte allerdings GM-CSF seine Wirkung in Gegenwart von IL-3 nicht voll entfalten können, könnte eine IL-3-Inaktivierung durch einen Antikörper tatsächlich sogar den GM-CSF-Effekt steigern und verstärkt im Sinne einer EAE-Induktion wirken.

Folglich lassen die Ergebnisse der IL-3-Blockadeversuche insgesamt viel Interpretationsspielraum. Ursächlich für die wenig ausgeprägte EAE in allen drei Versuchen könnten zum einen Schwierigkeiten bei der Induktion der Erkrankung sein. Der Nachweis eines Therapieeffektes, sofern tatsächlich vorhanden, wäre dann nur schwer zu erbringen. Zum anderen könnte sowohl durch die spezifische Antikörperblockade als auch durch das unspezifische IgG die Läsionslast reduziert worden sein. Letzteres lässt sich mangels einer adäquaten Kontrolle aber nicht belegen. Zieht man jedoch zum Vergleich die Kontrollgruppe des IL-3-Versuchs heran, fällt eine wesentlich höhere Läsionslast der gänzlich Untherapierten auf. Trotz desselben Induktionsprotokolls können allerdings zwischen zwei Versuchen, beispielsweise durch geringe Abweichungen in den Haltungsbedingungen der Tiere oder eine gering differierende Versuchslänge, diskrepante EAE-Ausprägungen entstehen, sodass ein solcher Vergleich nicht sicher ist und allenfalls als schwaches Indiz gelten kann.

4.5 Schlussfolgerung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche dokumentieren einen ausgeprägt proinflammatorischen Effekt durch eine i.p.-Applikation von Interleukin-3. Das peripher verabreichte Zytokin führt zur klinischen Verschlechterung und erhöht signifikant die Läsionslast nach Induktion einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis. Mit den hier verwendeten Methoden lässt sich jedoch kein spezifischer Wirkmechanismus belegen. Die heute vorliegenden Erkenntnisse zu IL-3 lassen jedoch vermuten, dass das Zytokin als Bindeglied zwischen Entzündungsreaktionen und Hämatopoese fungiert und so zum einen durch eine drastische Erhöhung der Anzahl von Immunzellen, zum anderen durch Erleichterung der Migration dieser Zellen ins ZNS, die Enzephalomyelitis verstärkt.

Trotz des fehlenden Nachweises eines protektiven Effektes einer anti-IL-3-Therapie in allen drei Versuchen, unabhängig vom Glykosylierungsstatus des Antikörpers, kann keine endgültige Beurteilung des Behandlungsnutzens erfolgen. Ursächlich hierfür ist die methodische Schwäche im Versuchsaufbau, der keine gänzlich unbehandelte Kontrollgruppe vorsah. Somit scheint möglich, dass die IgG-Kontrollgruppe durch die Immunglobuline eine deutliche Reduktion der Läsionslast erfuhr und damit ein Therapieerfolg durch die IL-3-Blockade maskiert wird. Für i.p.-verabreichtes, gepooltes humanes IgG wurden in EAE-Versuchen protektive Effekte beschrieben. Analog wird beim Menschen die intravenöse Immunglobulintherapie im Rahmen der MS seit Jahrzehnten erforscht und diskutiert, bislang ist diese Therapie jedoch nicht zugelassen

(Bayry et al. 2015, Berger et al. 2014, Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012). Als weitere Möglichkeit für die geringen Läsionslasten in den anti-IL-3-Antikörperversuchen muss aber vor allem auch eine unzureichende Induktion gehandelt werden. Zur Klärung können hier nur Wiederholungsversuche mit tatsächlich nicht therapierten Kontrollen beitragen.

4.6 Ausblick

Interleukin-3 ist als potenter Stimulator der Hämatopoese im Kontext immunologischer Reaktionen in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung geraten. Erst kürzlich konnte eine entscheidende Rolle als indirekter Auslöser einer unkontrollierten, äußerst gefährlichen systemischen Wirtsreaktion im Rahmen der Sepsisforschung nachgewiesen werden (Weber et al. 2015). Der Einfluss des Zytokins auf neuroinflammatorische Erkrankungen, insbesondere auf die multiple Sklerose, ist bislang wenig erforscht. Allerdings wird diesbezüglich heute dem eng verwandten GM-CSF eine wachsende Bedeutung zugeschrieben, sodass eine Beteiligung von IL-3 in der Pathogenese der EAE ebenfalls möglich erscheint.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-3 eine EAE verschlechtern kann, allerdings konnte nicht geklärt werden, ob IL-3 für die Ausbildung der EAE unabdingbar ist. In der Folge bleibt zu untersuchen, ob die periphere Blockade des Interleukins alleine oder auch in Verbindung mit der Blockade anderer Zytokine wie GM-CSF tatsächlich die Ausbildung der Enzephalomyelitis verhindern bzw. ihr Ausmaß signifikant reduzieren kann. Tatsächlich haben die aufsehenerregenden Arbeiten, die GM-CSF eine Schlüsselrolle für die Entstehung der EAE zusprachen und eine solche für die MS prognostizierten, inzwischen zu klinischen Versuchen mit einer GM-CSF-Antikörpertherapie geführt. Bislang liegen hier aber nur Ergebnisse zur Medikamentensicherheit vor, eine abschließende Beurteilung der Effektivität einer solchen Therapie ist noch nicht erfolgt (Constantinescu et al. 2015). Aufgrund der komplexen Wechselwirkungen innerhalb der GM-CSF/IL-3/IL-5-Rezeptorfamilie erscheint auch eine Blockade aller drei Zytokine eine erwägenswerte therapeutische Option. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre hierfür die von den drei Zytokinen gemeinsam genutzte β c-Rezeptoruntereinheit, wie es für die Behandlung anderer entzündlicher Erkrankungen kürzlich vorgeschlagen wurde (Panousis et al. 2015). Im Mausmodell wäre hier allerdings die Besonderheit des murinen IL-3-Rezeptors zu beachten, der IL-3 auch ohne mIL-3R β c mithilfe der β_{IL-3} -Rezeptoruntereinheit bindet. Zudem bleibt abzuwarten, welche unerwünschten Wirkungen durch eine solche Ausschaltung des Signalweges gleich aller drei Zytokine hervorgerufen werden können.

Erst wenn sich in weiteren tierexperimentellen Untersuchungen ein positiver Einfluss einer IL-3-Antikörpertherapie oder der oben beschriebenen Rezeptorblockade sicher nachweisen lässt und keine schweren Nebenwirkungen zu beobachten sind, können neue

therapeutische Konzepte für neuroinflammatorische Erkrankungen des Menschen, insbesondere der multiplen Sklerose, erarbeitet werden.

5 Zusammenfassung

Die multiple Sklerose ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, deren Ursache trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung weiterhin im Unklaren bleibt. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, eine im Labortier induzierte neuroinflammatorische Erkrankung, hat viel zum Verständnis der sich im Rahmen von zentralnervösen Entzündungen abspielenden Prozesse beigetragen. Trotz einiger offensichtlichen Unterschiede zur MS wird die EAE daher heute weiterhin als Tiermodell zur Erforschung einzelner Teilaspekte der Erkrankung herangezogen.

Als für die Ausbildung einer EAE wichtige Zellgruppe wurden lange $CD4^+$ - T_H1 -Lymphozyten gehandelt. Dieses Modell wurde durch eine neu entdeckte T_H17 -Helferzell-Subpopulation erweitert, der fortan im Rahmen der EAE enzephalitogene Eigenschaften zugesprochen wurden. Das von diesen Zellen sezernierte IL-17 scheint hingegen für eine EAE-Induktion entbehrlich. Zunehmende Aufmerksamkeit wurde jedoch dem GM-CSF gewidmet, da gezeigt werden konnte, dass dieses Zytokin essentiell für die Ausbildung einer EAE ist. Diskutiert wird, ob eine eigenständige GM-CSF-produzierende T-Helferzell-Subpopulation besteht, die sowohl für EAE als auch MS von pathogenetischer Bedeutung ist. Die enzephalitogenen Zellen sezernieren zudem Interleukin-3. Zwischen GM-CSF und IL-3, die beide einer gemeinsamen Zytokinfamilie zugerechnet werden, besteht eine enge Verwandtschaft. Gemeinsam mit IL-5 teilen sich die Wachstumsfaktoren die β -Untereinheit ihrer Rezeptoren und sind über verschiedene Mechanismen in der Lage, sich gegenseitig zu beeinflussen.

Durch seine Fähigkeit, Zellwachstum in immunologischen Ausnahmesituationen erheblich zu steigern, nimmt Interleukin-3 eine Art Schnittstellenfunktion zwischen Hämatopoese und Inflammation ein. Gleichzeitig besitzt das Interleukin zahlreiche direkte Wirkungen außerhalb seines Kolonie-stimulierenden Einflusses und vermag so beispielsweise die Zellmigration ins ZNS zu erleichtern. Dies vorweggenommen, scheint eine Beteiligung an neuroinflammatorischen Prozessen plausibel, die bisherige Forschung diesbezüglich beschränkt sich allerdings auf wenige Arbeiten, die bis jetzt keine abschließende Bewertung erlauben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Interleukin-3 auf die Läsionslast der EAE zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurde in C57BL/6 (H-2b)-Mäusen durch MOG-Peptid 35-55 eine EAE induziert. In einem ersten Versuch wurde den Tieren nach fünf Tagen IL-3 i.p. appliziert. In insgesamt drei weiteren Versuchen erfolgte parallel zur Immunisierung eine anti-IL-3-Antikörperbehandlung, während eine Kontrollgruppe IgG erhielt. Der klinische Verlauf wurde mittels einer fünfstufigen EAE-Skala erfasst. Nach Tötung der Tiere erfolgte die histologische Aufarbeitung der Präparate. Anhand der

LFB/PAS-Färbung konnten die Läsionen gut detektiert und vermessen werden. Mittels der immunhistochemischen CD3-Färbung wurde die T-Zellzahl pro Quadratmillimeter im gesamten Rückenmarksquerschnitt als Zweitkriterium erfasst.

Die anschließende Auswertung der Ergebnisse zeigte eine deutliche Zunahme der Läsionsfläche unter dem Einfluss der Behandlung mit IL-3 sowie eine, wenn auch nicht signifikante, Zunahme der T-Zell-Infiltration. Auch klinisch waren die Tiere unter IL-3-Einfluss stärker betroffen.

Insgesamt entwickelten nur verhältnismäßig wenige Tiere eine EAE. Bei diesen waren dann die Läsionslasten niedrig und die T-Zell-Infiltration nicht ausgeprägt. Dies betraf sowohl die Therapie- als auch die Kontrollgruppe. Ursächlich für die auch in der Kontrollgruppe niedrigen Läsionslasten könnte das diesen Tieren parallel zur Immunisierung verabreichte IgG sein. In diesem Fall wäre allerdings auch von einem therapeutischen Effekt der anti-IL-3-Behandlung auszugehen, der sich allerdings dann nicht signifikant von dem durch die Immunglobulinapplikation erreichten unterscheiden würde. Alternativ muss eine mangelhafte EAE-Induktion in den anti-IL-3-Versuchen, beispielsweise durch versehentliches Abweichen vom Immunisierungsprotokoll, als Ursache erwogen werden. Eine Klärung dieser Frage kann letztlich nur durch Wiederholungsversuche mit einer gänzlich unbehandelten Kontrollgruppe erfolgen.

Insgesamt erlauben die Ergebnisse dieser Arbeit also den Schluss, dass Interleukin-3 eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems deutlich zu verstärken vermag und somit sehr wohl eine pathogenetische Bedeutung für EAE und letztlich auch MS haben könnte. Allerdings konnte nicht geklärt werden, ob IL-3 essentiell für die Ausbildung einer EAE ist und somit einen sinnvollen therapeutischen Ansatzpunkt zur Behandlung neuroinflammatorischer Erkrankungen wie der MS bietet. In der Folge wären weitere Studien zur therapeutischen Blockade des Interleukins, ggf. auch in Kombination mit einer GM-CSF-Blockade, im Tiermodell sinnvoll. Sollten sich hier positive Ergebnisse zeigen, wären Studien zu einer solchen Antikörpertherapie auch bei MS-Patienten zu erwägen.

6 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S: Cellular and molecular immunology. 8. Auflage (Kindle Edition); Elsevier Saunders, Philadelphia 2014

Achiron A, Gilad R, Margalit R, Gabbay U, Sarova-Pinhas I, Cohen IR, Melamed E, Lider O, Noy S, Ziv I (1994a): Intravenous gammaglobulin treatment in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: delineation of usage and mode of action. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 57, 57–61

Achiron A, Margalit R, Herschkoviz R, Markovits D, Reshef T, Melamed E, Cohen IR, Lider O (1994b): Intravenous immunoglobulin treatment of experimental T cell-mediated autoimmune disease. Upregulation of T cell proliferation and downregulation of tumor necrosis factor alpha secretion. *J Clin Invest* 93(2), 600–605

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie M-H, 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(3), 1910–1914

Albert M, Antel J, Brück W, Stadelmann C (2007): Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis. *Brain Pathol* 17(2), 129–138

Amor S, Groome N, Linington C, Morris MM, Dornmair K, Gardinier MV, Matthieu JM, Baker D (1994): Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J Immunol* 153, 4349–4356

Appel K, Honegger P, Gebicke-Haerter PJ (1995): Expression of interleukin-3 and tumor necrosis factor-beta mRNAs in cultured microglia. *J Neuroimmunol* 60(1–2), 83–91

Ascherio A, Munch M (2000): Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology* 11(2), 220–224

Ascherio A, Munger KL, Giovannucci E (2011): Sun exposure and vitamin D are independent risk factors for CNS demyelination. *Neurology* 77(14), 1405; author reply 1405–6

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S et al. (2000): Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192(3), 393–404

Bagley CJ, Woodcock JM, Stomski FC, Lopez AF (1997): The structural and functional basis of cytokine receptor activation: lessons from the common beta subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors. *Blood* 89(5), 1471–1482

Baker D, Amor S (2014): Experimental autoimmune encephalomyelitis is a good model of multiple sclerosis if used wisely. *Mult Scler Relat Disord* 3(5), 555–564

Baranzini SE, Elfstrom C, Chang S-Y, Butunoi C, Murray R, Higuchi R, Oksenberg JR (2000): Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *J Immunol* 165(11), 6576–6582

Barnett MH, Prineas JW (2004): Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55(4), 458–468

Barnett MH, Parratt JDE, Pollard JD, Prineas JW (2009): MS: is it one disease? *Int MS J* 16(2), 57–65

Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M (2004): Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* 28(5), 509–554

- Barreto AD, Brod SA, Bui T-T, Jemelka JR, Kramer LA, Ton K, Cohen AM, Lindsey JW, Nelson F, Narayana PA et al. (2013): Chronic cerebrospinal venous insufficiency. *Ann Neurol* 73(6), 721–728
- Barry SC, Korpelainen E, Sun Q, Stomski FC, Moretti PA, Wakao H, D'Andrea RJ, Vadas MA, Lopez AF, Goodall GJ (1997): Roles of the N and C terminal domains of the interleukin-3 receptor alpha chain in receptor function. *Blood* 89(3), 842–852
- Bates D (2011): Treatment effects of immunomodulatory therapies at different stages of multiple sclerosis in short-term trials. *Neurology* 76(1 Suppl 1), S14-25
- Batoulis H, Recks MS, Addicks K, Kuerten S (2011): Experimental autoimmune encephalomyelitis - achievements and prospective advances. *APMIS* 119(12), 819–830
- Baxter AG (2007): The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7(11), 904–912
- Bayry J, Hartung H-P, Kaveri SV (2015): IVIg for relapsing–remitting multiple sclerosis: promises and uncertainties. *Trends Pharmacol Sci* 36(7), 419–421
- Bazan JF (1990a): Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* 11(10), 350–354
- Bazan JF (1990b): Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(18), 6934–6938
- Becher B, Durell BG, Noelle RJ (2002): Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 110(4), 493–497
- Becher B, Durell BG, Noelle RJ (2003): IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 112(8), 1186–1191
- Becklund BR, Severson KS, Vang SV, DeLuca HF (2010): UV radiation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis independent of vitamin D production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(4), 6418–6423
- Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, Shah TS, Spencer C, Booth D, Goris A (2013): Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 45(11), 1353–1360
- Behan PO, Chaudhuri A (2010): The sad plight of multiple sclerosis research (low on fact, high on fiction): critical data to support it being a neurocristopathy. *Inflammopharmacology* 18(6), 265–290
- Ben-Nun A, Yossefi S, Lehmann D (1993): Protection against autoimmune disease by bacterial agents. II. PPD and pertussis toxin as proteins active in protecting mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 23(3), 689–696
- Ben-Nun A, Kaushansky N, Kawakami N, Krishnamoorthy G, Berer K, Liblau R, Hohlfeld R, Wekerle H (2014): From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: impact on understanding pathogenesis and drug development. *J Autoimmun* 54, 33–50
- Berger T, Jacobi C, Haas J, Ransmayr G, Guger M, Zettl UK, Di Pauli F, Taumberger B, Wietek S, Meuer S (2014): Predicting therapeutic efficacy of intravenous immunoglobulin (IVIg) in individual patients with relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS) by functional genomics. *J Neuroimmunol* 277(1–2), 145–152
- Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, Sobel RA, Glimcher LH, Kuchroo VK (2004): Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 200(1), 79–87
- Bielekova B, Sung M-H, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R (2004): Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 172(6), 3893–3904
- Bitsch A, Brück W (2002): Differentiation of multiple sclerosis subtypes: implications for treatment. *CNS Drugs* 16(6), 405–418

- Blanchette F, Neuhaus O (2008): Glatiramer Acetate. *J Neurol* 255(S1), 26–36
- Bø L, Vedeler CA, Nyland H, Trapp BD, Mørk SJ (2003a): Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Mult Scler* 9(4), 323–331
- Bø L, Vedeler CA, Nyland HI, Trapp BD, Mørk SJ (2003b): Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 62(7), 723–732
- Breij ECW, Brink BP, Veerhuis R, van den Berg C, Vloet R, Yan R, Dijkstra CD, van der Valk P, Bö L (2008): Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol* 63(1), 16–25
- Brink BP, Veerhuis R, Breij ECW, van der Valk P, Dijkstra CD, Bö L (2005): The pathology of multiple sclerosis is location-dependent: no significant complement activation is detected in purely cortical lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(2), 147–155
- Brizzi MF, Garbarino G, Rossi PR, Pagliardi GL, Arduino C, Avanzi GC, Pegoraro L (1993): Interleukin 3 stimulates proliferation and triggers endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 gene activation of human endothelial cells. *J Clin Invest* 91(6), 2887–2892
- Brizzi MF, Formato L, Dentelli P, Rosso A, Pavan M, Garbarino G, Pegoraro M, Camussi G, Pegoraro L (2001): Interleukin-3 stimulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells: a potential role in atherogenesis. *Circulation* 103(4), 549–554
- Brod SA, Kramer LA, Cohen AM, Barreto AD, Bui T-T, Jemelka JR, Ton K, Lindsey JW, Nelson F, Narayana PA et al. (2013): Chronic cerebrospinal venous insufficiency: masked multimodal imaging assessment. *Mult Scler* 19(11), 1499–1507
- Broughton SE, Hercus TR, Hardy MP, McClure BJ, Nero TL, Dottore M, Huynh H, Braley H, Barry EF, Kan WL et al. (2014a): Dual mechanism of interleukin-3 receptor blockade by an anti-cancer antibody. *Cell Rep* 8(2), 410–419
- Broughton SE, Hercus TR, Nero TL, Dhagat U, Owczarek CM, Hardy MP, Fabri LJ, Scotney PD, Nash AD, Wilson NJ et al. (2014b): Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the interleukin-3 alpha receptor bound to the Fab fragment of antibody CSL362. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70(3), 358–361
- Brownell B, Hughes JT (1962): The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 25, 315–320
- Brück W (2005): Inflammatory demyelination is not central to the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurol* 252(S5), v10-v15
- Brunetti L, Wagner ML, Maroney M, Ryan M (2013): Teriflunomide for the treatment of relapsing multiple sclerosis: a review of clinical data. *Ann Pharmacother* 47(9), 1153–60
- Budel LM, Elbaz O, Hoogerbrugge H, Delwel R, Mahmoud LA, Löwenberg B, Touw IP (1990): Common binding structure for granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on human acute myeloid leukemia cells and monocytes. *Blood* 75(7), 1439–1445
- Büdingen H-C, Harrer MD, Kuenzle S, Meier M, Goebels N (2008): Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies. *Eur J Immunol* 38(7), 2014–2023
- Büdingen H-C, Gulati M, Kuenzle S, Fischer K, Rupprecht TA, Goebels N (2010): Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system autoimmune demyelination produce “oligoclonal bands”. *J Neuroimmunol* 218(1–2), 134–139
- Calabrese M, Gallo P (2009): Magnetic resonance evidence of cortical onset of multiple sclerosis. *Mult Scler* 15(8), 933–941
- Campbell IL (1998): Transgenic mice and cytokine actions in the brain: bridging the gap between structural and functional neuropathology. *Brain Res Brain Res Rev* 26(2–3), 327–336

- Carbajal KS, Mironova Y, Ulrich-Lewis JT, Kulkarni D, Grifka-Walk HM, Huber AK, Shrager P, Giger RJ, Segal BM (2015): Th cell diversity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Immunol* 195(6), 2552–2559
- Carr PD, Gustin SE, Church AP, Murphy JM, Ford SC, Mann DA, Woltring DM, Walker I, Ollis DL, Young IG (2001): Structure of the complete extracellular domain of the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3, and IL-5 receptors reveals a novel dimer configuration. *Cell* 104(2), 291–300
- Carr PD, Conlan F, Ford S, Ollis DL, Young IG (2006): An improved resolution structure of the human β common receptor involved in IL-3, IL-5 and GM-CSF signalling which gives better definition of the high-affinity binding epitope. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun* 62(6), 509–513
- Carr PD, Ewens CL, Dai J, Ollis DL, Murphy JM, Jackson CJ, Young IG (2014): Crystal structure of the mouse interleukin-3 β -receptor: insights into interleukin-3 binding and receptor activation. *Biochem J* 463(3), 393–403
- Cermelli C, Berti R, Soldan SS, Mayne M, D'ambrosia JM, Ludwin SK, Jacobson S (2003): High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis* 187(9), 1377–1387
- Chaudhuri A (2013): Multiple sclerosis is primarily a neurodegenerative disease. *J Neural Transm* 120(10), 1463–1466
- Chavany C, Vicario-Abejón C, Miller G, Jendoubi M (1998): Transgenic mice for interleukin 3 develop motor neuron degeneration associated with autoimmune reaction against spinal cord motor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(19), 11354–11359
- Chen J, Olsen J, Ford S, Mirza S, Walker A, Murphy JM, Young IG (2009): A new isoform of interleukin-3 receptor with novel differentiation activity and high affinity binding mode. *J Biol Chem* 284(9), 5763–5773
- Chen Y (2006): Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 116(5), 1317–1326
- Chetty R, Gatter K (1994): CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. *J Pathol* 173(4), 303–307
- Chiang CS, Powell HC, Gold LH, Samimi A, Campbell IL (1996): Macrophage/microglial-mediated primary demyelination and motor disease induced by the central nervous system production of interleukin-3 in transgenic mice. *J Clin Invest* 97(6), 1512–1524
- Chong WP, Ling MT, Liu Y, Caspi RR, Wong WM, Wu W, Tu W, Lau YL (2013): Essential role of NK cells in IgG therapy for experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 8(4), e60862
- Clark-Lewis IA, Schrader JW: Molecular structure and biological activities of P cell-stimulating factor (interleukin 3). In: Schrader JW (Hrsg.): *Interleukin 3: The panspecific hemopoitin*. Lymphokines Bd. 15. Academic Press/Elsevier, San Diego u.a. 1988, 1–37
- Comi G (2013): Disease-modifying treatments for progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 19(11), 1428–1436
- Comi G, Battaglia M, Bertolotto A, Sette MD, Ghezzi A, Malferrari G, Salvetti M, Sormani M, Tesio L, Stolz E (2013): Observational case-control study of the prevalence of chronic cerebrospinal venous insufficiency in multiple sclerosis: results from the CoSMo study. *Mult Scler* 19(11), 1508–1517
- Compston A, Coles A (2008): Multiple sclerosis. *Lancet* 372(9648), 1502–1517
- Conradi S, Malzahn U, Schröter F, Paul F, Quill S, Spruth E, Harms L, Bergh F, Ditzenbach A, Georgi T (2011): Environmental factors in early childhood are associated with multiple sclerosis: a case-control study. *BMC Neurol* 11(1), 123
- Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B (2011): Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol* 164(4), 1079–1106

- Constantinescu CS, Asher A, Fryze W, Kozubski W, Wagner F, Aram J, Tanasescu R, Korolkiewicz RP, Dirnberger-Hertweck M, Steidl S (2015): Randomized phase 1b trial of MOR103, a human antibody to GM-CSF, in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2(4), e117
- Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Cardilicchia E, Frosali F, Querci V, Angeli R, Matucci A, Fambrini M (2010): Identification of a novel subset of human circulating memory CD4⁺ T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 125(1), 222-230.e1-e4
- Cua DJ, Hinton DR, Stohlman SA (1995): Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice. Th2-mediated suppression of autoimmune disease. *J Immunol* 155(8), 4052–4059
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T et al. (2003): Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421(6924), 744–748
- Day MJ: Histopathology of EAE. In: Lavi E, Constantinescu CS (Hrsg.): *Experimental models of multiple sclerosis*. Springer US, Boston 2005, 25–43
- Dentelli P, Rosso A, Calvi C, Ghiringhella B, Garbarino G, Camussi G, Pegoraro L, Brizzi MF (2004): IL-3 affects endothelial cell-mediated smooth muscle cell recruitment by increasing TGF β activity: potential role in tumor vessel stabilization. *Oncogene* 23(9), 1681–1692
- Derfuss T, Gürkrov R, Then Bergh F, Goebels N, Hartmann M, Barz C, Wilske B, Autenrieth I, Wick M, Hohlfeld R (2001): Intrathecal antibody production against *Chlamydia pneumoniae* in multiple sclerosis is part of a polyspecific immune response. *Brain* 124(Pt 7), 1325–1335
- Dey R, Ji K, Liu Z, Chen L, Xu W (2009): A cytokine–cytokine interaction in the assembly of higher-order structure and activation of the interleukin-3:receptor complex. *PLoS One* 4(4), e5188
- Domingues HS, Mues M, Lassmann H, Wekerle H, Krishnamoorthy G, Unutmaz D (2010): Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 5(11), e15531
- Dorschers L, Burger H, Bot F, Delwel R, van Geurts Kessel AH, Löwenberg B, Wagemaker G (1987): Characterization of a human multilineage-colony-stimulating factor cDNA clone identified by a conserved noncoding sequence in mouse interleukin-3. *Gene* 55(1), 115–124
- Duan S, Lv Z, Fan X, Wang L, Han F, Wang H, Bi S (2014): Vitamin D status and the risk of multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Lett* 570, 108–113
- El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang G-X, Dittel BN, Rostami A (2011): The encephalitogenicity of TH17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12(6), 568–575
- Elliott MJ, Vadas MA, Cleland LG, Gamble JR, Lopez AF (1990): IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate two distinct phases of adhesion in human monocytes. *J Immunol* 145(1), 167–176
- Ephrem A, Chamat S, Miquel C, Fisson S, Mouthon L, Caligiuri G, Delignat S, Elluru S, Bayry J, Lacroix-Desmazes S (2008): Expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 111(2), 715–722
- Evans C, Beland S-G, Kulaga S, Wolfson C, Kingwell E, Marriott J, Koch M, Makhani N, Morrow S, Fisk J (2013): Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the americas: a systematic review. *Neuroepidemiology* 40(3), 195–210
- Falcone M, Bloom BR (1997): A T helper cell 2 (Th2) immune response against non-self antigens modifies the cytokine profile of autoimmune T cells and protects against experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 185(5), 901–907
- Farrar WL, Vinocour M, Hill JM (1989): In situ hybridization histochemistry localization of interleukin-3 mRNA in mouse brain. *Blood* 73(1), 137–140

- Fasbender P, Kölmel HW (2008): Incidence of multiple sclerosis in the urban area of Erfurt, Thuringia, Germany. *Neuroepidemiology* 30(3), 147–151
- Feng Y, Klein BK, McWherter CA (1996): Three-dimensional solution structure and backbone dynamics of a variant of human interleukin-3. *J Mol Biol* 259(3), 524–541
- Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG (1996): Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 156(1), 5–7
- Filippini G, Brusafferri F, Sibley WA, Citterio A, Ciucci G, Midgard R, Candelise L (2000): Corticosteroids or ACTH for acute exacerbations in multiple sclerosis *Cochrane Database Syst Rev* (4), CD001331
- Fleming KK, Bovaird JA, Mosier MC, Emerson MR, LeVine SM, Marquis JG (2005): Statistical analysis of data from studies on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 170(1–2), 71–84
- Frei K, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A (1986): Astrocyte-derived interleukin 3 as a growth factor for microglia cells and peritoneal macrophages. *J Immunol* 137(11), 3521–3527
- Frendl G (1992): Interleukin 3: from colony-stimulating factor to pluripotent immunoregulatory cytokine. *Int J Immunopharmacol* 14(3), 421–430
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009): The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132(Pt 5), 1175–1189
- Fung MC, Hapel AJ, Ymer S, Cohen DR, Johnson RM, Campbell HD, Young IG (1984): Molecular cloning of cDNA for murine interleukin-3. *Nature* 307(5948), 233–237
- Furtado GC, Marcondes MCG, Latkowski J-A, Tsai J, Wensky A, Lafaille JJ (2008): Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 181(7), 4648–4655
- Gafson A, Giovannoni G, Hawkes CH (2012): The diagnostic criteria for multiple sclerosis: from Charcot to McDonald. *Mult Scler Relat Disord* 1(1), 9–14
- Gajofatto A, Benedetti MD (2015): Treatment strategies for multiple sclerosis: when to start, when to change, when to stop? *World J Clin Cases* 3(7), 545–555
- Garland JM, Dexter TM (1982): 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase expression in hemopoietic cell cultures and its relationship to interleukin 3. *Eur J Immunol* 12(12), 998–1001
- Garland JM, Lanotte M, Dexter TM (1982): Expression of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in nonlymphoid hemopoietic cell lines. *Eur J Immunol* 12(4), 332–336
- Gebicke-Haerter PJ, Appel K, Taylor GD, Schobert A, Rich IN, Northoff H, Berger M (1994): Rat microglial interleukin-3. *J Neuroimmunol* 50(2), 203–214
- Geurts JJG, Bö L, Roosendaal SD, Hazes T, Daniëls R, Barkhof F, Witter MP, Huitinga I, van der Valk P (2007): Extensive hippocampal demyelination in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 66(9), 819–827
- Ghezzi A (2013): Funding CCSVI research is/was a waste of valuable time, money and intellectual energy: yes. *Mult Scler* 19(7), 855–857
- Gilden DH (2005): Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 4(3), 195–202
- Gillis S, Urdal DL, Clevenger W, Klinke R, Sassenfeld H, Price V, Cosman D (1988): Production of recombinant human colony stimulating factors in yeast. *Behring Inst Mitt* (83), 1–7
- Gilmore CP, Donaldson I, Bö L, Owens T, Lowe J, Evangelou N (2009): Regional variations in the extent and pattern of grey matter demyelination in multiple sclerosis: a comparison between the cerebral cortex, cerebellar cortex, deep grey matter nuclei and the spinal cord. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80(2), 182–187

- Giovannoni G, Cutter GR, Lunemann J, Martin R, Münz C, Sriram S, Steiner I, Hammerschlag MR, Gaydos CA (2006): Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 5(10), 887–894
- Giulian D, Ingeman JE (1988): Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *J Neurosci* 8(12), 4707–4717
- Gold R (2006): Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129(Pt 8), 1953–1971
- Goldberg P, Fleming MC, Picard EH (1986): Multiple sclerosis: decreased relapse rate through dietary supplementation with calcium, magnesium and vitamin D. *Med Hypotheses* 21(2), 193–200
- Goodall GJ, Bagley CJ, Vadas MA, Lopez AF (1993): A model for the interaction of the GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors with their ligands. *Growth Factors* 8(2), 87–97
- Gorman DM, Itoh N, Kitamura T, Schreurs J, Yonehara S, Yahara I, Arai K, Miyajima A (1990): Cloning and expression of a gene encoding an interleukin 3 receptor-like protein: identification of another member of the cytokine receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(14), 5459–5463
- Gorman DM, Itoh N, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Miyajima A (1992): Chromosomal localization and organization of the murine genes encoding the beta subunits (AIC2A and AIC2B) of the interleukin 3, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, and interleukin 5 receptors. *J Biol Chem* 267(22), 15842–15848
- Gran B, Zhang G-X, Yu S, Li J, Chen X-H, Ventura ES, Kamoun M, Rostami A (2002): IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* 169(12), 7104–7110
- Grant WB, Mascitelli L (2012): Evidence that the north–south gradient of multiple sclerosis may not have disappeared. *J Neurol Sci* 315(1–2), 178–179
- Grau GE, Piguet P-F, Vassalli P, Lambert P-H (1989): Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. *Immunol Rev* 112(1), 49–70
- Greenberg SJ, Ehrlich GD, Abbott MA, Hurwitz BJ, Waldmann TA, Poiesz BJ (1989): Detection of sequences homologous to human retroviral DNA in multiple sclerosis by gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8), 2878–2882
- Gregory B, Kirchem A, Phipps S, Gevaert P, Pridgeon C, Rankin SM, Robinson DS (2003): Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor α -chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor expression. *J Immunol* 170(11), 5359–5366
- Grifka-Walk HM, Giles DA, Segal BM (2015): IL-12-polarized Th1 cells produce GM-CSF and induce EAE independent of IL-23. *Eur J Immunol* 45, 1–7
- Groot RP de, Coffey PJ, Koenderman L (1998): Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cell Signal* 10(9), 619–628
- Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, Dodel R, Ekman M, Faravelli C, Fratiglioni L (2011): Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 21(10), 718–779
- Hackett J, Swanson P, Leahy D, Anderson EL, Sato S, Roos RP, Decker R, Devare SG (1996): Search for retrovirus in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 40(5), 805–809
- Handel AE, Lincoln MR, Ramagopalan SV (2011a): Of mice and men: experimental autoimmune encephalitis and multiple sclerosis. *Eur J Clin Invest* 41(11), 1254–1258
- Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan SV (2011b): Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *PLoS One* 6(1), e16149

- Hansen G, Hercus TR, McClure BJ, Stomski FC, Dottore M, Powell J, Ramshaw H, Woodcock JM, Xu Y, Guthridge M (2008): The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell* 134(3), 496–507
- Hapel AJ, Osborne JM, Fung MC, Young IG, Allan W, Hume DA (1985): Expression of 20-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in mouse macrophages, hemopoietic cells, and cell lines and its induction by colony-stimulating factors. *J Immunol* 134(4), 2492–2497
- Hara T, Miyajima A (1992): Two distinct functional high affinity receptors for mouse interleukin-3 (IL-3). *EMBO J* 11(5), 1875–1884
- Harbo HF, Utsi E, Lorentzen ÅR, Kampman MT, Celius EG, Myhr K-M, Lie BA, Mellgren SI, Thorsby E (2007): Low frequency of the disease-associated DRB1*15-DQB1*06 haplotype may contribute to the low prevalence of multiple sclerosis in Sami. *Tissue Antigens* 69(4), 299–304
- Hart PH, Gorman S, Finlay-Jones JJ (2011): Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? *Nat Rev Immunol* 11(9), 584–596
- Hartung H-P, Gonsette R, König N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, Krapf H, Zwingers T (2002): Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 360(9350), 2018–2025
- Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S (2008): B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 358(7), 676–688
- Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung H-P, Hemmer B, Lublin F, Montalban X, Rammohan KW, Selmaj K (2017): Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 376(3), 221–234
- Hawkes C (2005): Are multiple sclerosis patients risk-takers? *QJM* 98(12), 895–911
- Hawkes CH (2002): Is multiple sclerosis a sexually transmitted infection? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73(4), 439–443
- Hayashida K, Kitamura T, Gorman DM, Arai K, Yokota T, Miyajima A (1990): Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24), 9655–9659
- Hedström AK, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L (2013): Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *Eur J Epidemiol* 28(11), 867–874
- Hedström AK, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L (2014): Alcohol as a modifiable lifestyle factor affecting multiple sclerosis risk. *JAMA Neurol* 71(3), 300
- Henderson APD, Barnett MH, Parratt JDE, Prineas JW (2009): Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol* 66(6), 739–753
- Hercus TR, Dhagat U, Kan WL, Broughton SE, Nero TL, Perugini M, Sandow JJ, D'Andrea RJ, Ekert PG, Hughes T (2013): Signalling by the β c family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 24(3), 189–201
- Hernán MA, Olek MJ, Ascherio A (2001): Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol* 154(1), 69–74
- Hofstetter HH, Karulin AY, Forsthuber TG, Ott PA, Tary-Lehmann M, Lehmann PV (2005): The cytokine signature of MOG-specific CD4 cells in the EAE of C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 170(1–2), 105–114
- Hohlfeld R, Wekerle H (2004): Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(Suppl 2), 14599–14606

- Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, Serafini B, Aloisi F, Roncaroli F, Magliozzi R et al. (2011): Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain* 134(Pt 9), 2755–2771
- Htain WW, Leong SK, Ling EA (1998): Effects of interleukin-3 injection on supraventricular amoeboid microglial cells in neonatal BALB/c and athymic mice. *Neurosci Lett* 251(2), 133–136
- Huberman M, Shalit F, Roth-Deri I, Gutman B, Kott E, Sredni B (1993): Decreased IL-3 production by peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 118(1), 79–82
- Hughes A-M, Lucas RM, McMichael AJ, Dwyer T, Pender MP, van der Mei I, Taylor BV, Valery P, Chapman C, Coulthard A (2013): Early-life hygiene-related factors affect risk of central nervous system demyelination and asthma differentially. *Clin Exp Immunol* 172(3), 466–474
- Hurst EW (1932): The effects of the injection of normal brain emulsion into rabbits, with special reference to the aetiology of the paralytic accidents of antirabic treatment. *J Hyg (Lond)* 32(1), 33–44
- Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlén C, Goverman J (2001): A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 194(5), 669–676
- Hutchinson M (2013): Funding CCSVI research is/was a waste of valuable time, money and intellectual energy: commentary. *Mult Scler* 19(7), 861–862
- Ihle JN (1992): Interleukin-3 and hematopoiesis. *Chem Immunol* 51, 65–106
- Ihle JN, Pepersack L, Rebar L (1981): Regulation of T cell differentiation: in vitro induction of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes from athymic mice by a unique lymphokine. *J Immunol* 126(6), 2184–2189
- Ihle JN, Keller J, Oroszlan S, Henderson LE, Copeland TD, Fitch F, Prystowsky MB, Goldwasser E, Schrader JW, Palaszynski E (1983): Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. *J Immunol* 131(1), 282–287
- Jeong MC, Navani A, Oksenberg JR (1998): Limited allelic polymorphism in the human interleukin-3 gene. *Mol Cell Probes* 12(1), 49–53
- Ji Q, Goverman J (2007): Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by CD8+ T cells. *Ann N Y Acad Sci* 1103(1), 157–166
- Jiang X, Lopez A, Holyoake T, Eaves A, Eaves C (1999): Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22), 12804–12809
- Kabat EA, Wolf A, Bezer AE (1946): Rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of brain tissue with adjuvants. *Science* 104(2703), 362
- Kamegai M, Nijima K, Kunishita T, Nishizawa M, Ogawa M, Araki M, Ueki A, Konishi Y, Tabira T (1990): Interleukin 3 as a trophic factor for central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Neuron* 4(3), 429–436
- Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z (2004): Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol* 173(4), 2353–2361
- Karulin AY, Quast S, Hesse MD, Lehmann PV (2012): Neuroantigen-specific CD4 cells expressing interferon- γ (IFN- γ), interleukin (IL)-2 and IL-3 in a mutually exclusive manner prevail in experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *Cells* 1(4), 576–596
- Katz Sand IB, Lublin FD (2013): Diagnosis and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Continuum (Minneapolis Minn)* 19(4), 922–943

- 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(10), 1173–1175
- Keegan BM, Noseworthy JH (2002): Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 53, 285–302
- Keegan M, Pineda AA, McClelland RL, Darby CH, Rodriguez M, Weinshenker BG (2002): Plasma exchange for severe attacks of CNS demyelination: predictors of response. *Neurology* 58(1), 143–146
- Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R (2003): Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann Neurol* 53(3), 292–304
- Kim S, Prout M, Ramshaw H, Lopez AF, LeGros G, Min B (2010): Cutting edge: basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infection via IL-3, but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3. *J Immunol* 184(3), 1143–1147
- Kita H, Ohnishi T, Okubo Y, Weiler D, Abrams JS, Gleich GJ (1991): Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J Exp Med* 174(3), 745–748
- Kitamura T, Sato N, Arai K, Miyajima A (1991a): Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. *Cell* 66(6), 1165–1174
- Kitamura T, Takaku F, Miyajima A (1991b): IL-1 up-regulates the expression of cytokine receptors on a factor-dependent human hemopoietic cell line, TF-1. *Int Immunol* 3(6), 571–577
- Klaver R, Vries HE de, Schenk GJ, Geurts JJG (2013): Grey matter damage in multiple sclerosis: a pathology perspective. *Prion* 7(1), 66–75
- Kluver H, Barrera E (1953): A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 12(4), 400–403
- Kobelt G, Pugliatti M (2005): Cost of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 12(Suppl 1), 63–67
- Koch-Henriksen N, Sørensen PS (2010): The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 9(5), 520–532
- Koch-Henriksen N, Sørensen PS (2011): Why does the north–south gradient of incidence of multiple sclerosis seem to have disappeared on the northern hemisphere? *J Neurol Sci* 311(1–2), 58–63
- Konishi Y, Kamegai M, Takahashi K, Kunishita T, Tabira T (1994): Production of interleukin-3 by murine central nervous system neurons. *Neurosci Lett* 182(2), 271–274
- Koprowski H, DeFreitas EC, Harper ME, Sandberg-Wollheim M, Sheremata WA, Robert-Guroff M, Saxinger CW, Feinberg MB, Wong-Staal F, Gallo RC (1985): Multiple sclerosis and human T-cell lymphotropic retroviruses. *Nature* 318(6042), 154–160
- Kremenchutzky M, Cottrell D, Rice G, Hader W, Baskerville J, Koopman W, Ebers GC (1999): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 7. Progressive-relapsing and relapsing-progressive multiple sclerosis: a re-evaluation. *Brain* 122(Pt 10), 1941–1950
- Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM (2008): IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med* 205(7), 1535–1541
- Kuhlmann T, Miron V, Cuo Q, Wegner C, Antel J, Bruck W (2008): Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* 131(Pt 7), 1749–1758
- Kumar DR, Aslinia F, Yale SH, Mazza JJ (2011): Jean-Martin Charcot: the father of neurology. *Clin Med Res* 2(1), 46–49

- Kurtzke JF (2013): Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim's progress. *Brain* 136(Pt 9), 2904–2917
- Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H (2005): Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128(Pt 11), 2705–2712
- Kutzelnigg A, Faber-Rod JC, Bauer J, Lucchinetti CF, Sorensen PS, Laursen H, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Schmidbauer M (2007): Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 17(1), 38–44
- Kuwaki T, Kitamura T, Tojo A, Matsuki S, Tamai Y, Miyazono K, Takaku F (1989): Characterization of human interleukin-3 receptors on a multi-factor-dependent cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 161(1), 16–22
- Laatsch RH, Kies MW, Gordon S, Alvord EC (1962): The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation. *J Exp Med* 115, 777–788
- Lampinen M, Carlson M, Håkansson LD, Venge P (2004): Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* 59(8), 793–805
- Langer-Gould A, Brara SM, Beaber BE, Zhang JL (2013): Incidence of multiple sclerosis in multiple racial and ethnic groups. *Neurology* 80(19), 1734–1739
- 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(2), 233–240
- Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, Nawa Y, Dranoff G, Galli SJ (1998): Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392(6671), 90–93
- Lassmann H (2008): Models of multiple sclerosis: new insights into pathophysiology and repair. *Curr Opin Neurol* 21(3), 242–247
- Lassmann H (2010): What drives disease in multiple sclerosis: inflammation or neurodegeneration? *Clin Exp Neuroimmunol* 1(1), 2–11
- Lassmann H (2011): Review: the architecture of inflammatory demyelinating lesions: implications for studies on pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37(7), 698–710
- Lassmann H, van Horssen J (2011): The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett* 585(23), 3715–3723
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2001): Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7(3), 115–121
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2007): The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 17(2), 210–218
- Le Beau MM, Epstein ND, O'Brien SJ, Nienhuis AW, Yang YC, Clark SC, Rowley JD (1987): The interleukin 3 gene is located on human chromosome 5 and is deleted in myeloid leukemias with a deletion of 5q. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(16), 5913–5917
- Leary SM, Thompson AJ (2005): Primary progressive multiple sclerosis: current and future treatment options. *CNS Drugs* 19(5), 369–376
- Lehmann D, Ben-Nun A (1992): Bacterial agents protect against autoimmune disease. I. Mice pre-exposed to *Bordetella pertussis* or *Mycobacterium tuberculosis* are highly refractory to induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 5(6), 675–690
- Leibowitz U, Antonovsky A, Medalie JM, Smith HA, Halpern L, Alter M (1966): Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 29(1), 60–68

Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (2012): S2e-Leitlinie: Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. Gültig bis 29.09.2017.

<http://www.dgn.org/leitlinien/2333-ll-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose>;
Zugriff am 04.12.2016

Lemire JM, Archer DC (1991): 1,25-dihydroxyvitamin D₃ prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* **87**(3), 1103–1107

Levy H, Assaf Y, Frenkel D (2010): Characterization of brain lesions in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *Exp Neurol* **226**(1), 148–158

Liang SC, Tan X-Y, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA (2006): Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* **203**(10), 2271–2279

Libbey JE, Fujinami RS (2011): Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines. *Vaccine* **29**, 3356–3362

Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO (1995): Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* **16**(1), 34–38

Lidegaard O, Svendsen AL (2008): Sexual habits before multiple sclerosis: a national case control study. *Mult Scler* **14**(1), 67–72

Link J, Kockum I, Lorentzen ÅR, Lie BA, Celius EG, Westerlind H, Schaffer M, Alfredsson L, Olsson T, Brynedal B (2012): Importance of human leukocyte antigen (HLA) class I and II alleles on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One* **7**(5), e36779

Linker RA, Sendtner M, Gold R (2005): Mechanisms of axonal degeneration in EAE – lessons from CNTF and MHC I knockout mice. *J Neurol Sci* **233**(1–2), 167–172

Liu K, Zhu M, Huang Y, Wei S, Xie J, Xiao Y (2015): CD123 and its potential clinical application in leukemias. *Life Sci* **122**, 59–64

Locatelli G, Wörtge S, Buch T, Ingold B, Frommer F, Sobottka B, Krüger M, Karram K, Bühlmann C, Bechmann I (2012): Primary oligodendrocyte death does not elicit anti-CNS immunity. *Nat Neurosci* **15**(4), 543–550

Lopez AF, Elliott MJ, Woodcock J, Vadas MA (1992): GM-CSF, IL-3 and IL-5: cross-competition on human haemopoietic cells. *Immunol Today* **13**(12), 495–500

Lourenço F, Azor M, Santos J, Prearo E, Maruta C, Rivitti E, Duarte A, Sato M (2008): Activated status of basophils in chronic urticaria leads to interleukin-3 hyper-responsiveness and enhancement of histamine release induced by anti-IgE stimulus. *Br J Dermatol* **158**(5), 979–986

Lovas G, Szilágyi N, Majtényi K, Palkovits M, Komoly S (2000): Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain* **123**(Pt 2), 308–317

Lublin FD, Reingold SC (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* **46**(4), 907–911

Lucas RM, Ponsonby A-L, Dear K, Valery PC, Pender MP, Taylor BV, Kilpatrick TJ, Dwyer T, Coulthard A, Chapman C (2011): Sun exposure and vitamin D are independent risk factors for CNS demyelination. *Neurology* **76**(6), 540–548

Lucchinetti CF, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* **47**(6), 707–717

Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Brück W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C et al. (2011): Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* **365**(23), 2188–2197

- Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, Reynolds R, Aloisi F (2006): Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 130(Pt 4), 1089–1104
- Mancuso R, Saresella M, Hernis A, Agostini S, Piancone F, Caputo D, Maggi F, Clerici M (2013): Torque teno virus (TTV) in multiple sclerosis patients with different patterns of disease. *J Med Virol* 85(12), 2176–2183
- Marcus JF, Waubant EL (2013): Updates on clinically isolated syndrome and diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Neurohospitalist* 3(2), 65–80
- Markovic M, Trajkovic V, Drulovic J, Mesaros S, Stojisavljevic N, Dujmovic I, Stojkovic MM (2003): Antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 211(1–2), 67–73
- Martinelli Boneschi F, Vacchi L, Rovaris M, Capra R, Comi G (2013): Mitoxantrone for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* (5), CD002127
- Massa J, O'Reilly E, Munger K, Ascherio A (2013): Caffeine and alcohol intakes have no association with risk of multiple sclerosis. *Mult Scler* 19(1), 53–58
- Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz J-D, Fujimoto M, Tedder TF (2008): Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest* 118(10), 3420–3430
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50(1), 121–127
- McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ (2007): TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 8(12), 1390–1397
- McGraw CA, Lublin FD (2013): Interferon beta and glatiramer acetate therapy. *Neurotherapeutics* 10(1), 2–18
- McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, Reid HH, Bernard CC (2001): Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med* 194(7), 873–882
- Mendel I, Rosbo NK de, Ben-Nun A (1995): A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: Fine specificity and T cell receptor V β expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 25(7), 1951–1959
- Merrill JE, Kono DH, Clayton J, Ando DG, Hinton DR, Hofman FM (1992): Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(2), 574–578
- Metcalf D (1986): The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 67(2), 257–267
- Metcalf D (1990): The colony stimulating factors. Discovery, development, and clinical applications. *Cancer* 65(10), 2185–2195
- Metcalf D, Begley CG, Johnson GR, Nicola NA, Lopez AF, Williamson DJ (1986): Effects of purified bacterially synthesized murine multi-CSF (IL-3) on hematopoiesis in normal adult mice. *Blood* 68(1), 46–57
- Miller DH, Leary SM (2007): Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 6(10), 903–912
- Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJM, Thompson AJ (2002): Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 125(Pt 8), 1676–1695

- Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O (2012): Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol* **11**(2), 157–169
- Mirza S, Chen J, Wen B, Ewens CL, Dai J, Murphy JM, Young IG (2010): Two modes of α -receptor recognition are mediated by distinct epitopes on mouse and human interleukin-3. *J Biol Chem* **285**(29), 22370–22381
- Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M (1999): Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* **5**(1), 49–55
- Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, Seze J de, Giovannoni G, Hartung H-P, Hemmer B et al. (2017): Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. *N Engl J Med* **376**(3), 209–220
- Montero E, Nussbaum G, Kaye JF, Perez R, Lage A, Ben-Nun A, Cohen IR (2004): Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: analysis using depleting antibodies. *J Autoimmun* **23**(1), 1–7
- Morla AO, Schreurs J, Miyajima A, Wang JY (1988): Hematopoietic growth factors activate the tyrosine phosphorylation of distinct sets of proteins in interleukin-3-dependent murine cell lines. *Mol Cell Biol* **8**(5), 2214–2218
- Mott HR, Campbell ID (1995): Four-helix bundle growth factors and their receptors: protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol* **5**(1), 114–121
- Multiple Sclerosis International Federation (2014): Atlas of MS 2013. Hrsg. v. Thompson AJ, Baneke P. <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2014/09/Atlas-of-MS.pdf>; Zugriff am 05.02.2017
- Murphy JM, Ford SC, Olsen JE, Gustin SE, Jeffrey PD, Ollis DL, Young IG (2004): Interleukin-3 binding to the murine β_{IL-3} and human β_c receptors involves functional epitopes formed by domains 1 and 4 of different protein chains. *J Biol Chem* **279**(25), 26500–26508
- Murray TJ (2009): The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J Neurol Sci* **277**(Suppl 1), S3-8
- Nakahara J, Maeda M, Aiso S, Suzuki N (2012): Current concepts in multiple sclerosis: autoimmunity versus oligodendroglionopathy. *Clin Rev Allergy Immunol* **42**(1), 26–34
- Nicola NA, Metcalf D (1986): Binding of iodinated multipotential colony-stimulating factor (interleukin-3) to murine bone marrow cells. *J Cell Physiol* **128**(2), 180–188
- Niehaus A, Shi J, Grzenkowski M, Diers-Fenger M, Archelos J, Hartung HP, Toyka K, Brück W, Trotter J (2000): Patients with active relapsing-remitting multiple sclerosis synthesize antibodies recognizing oligodendrocyte progenitor cell surface protein: implications for remyelination. *Ann Neurol* **48**(3), 362–371
- Niemeyer CM, Sieff CA, Mathey-Prevot B, Wimperis JZ, Bierer BE, Clark SC, Nathan DG (1989): Expression of human interleukin-3 (multi-CSF) is restricted to human lymphocytes and T-cell tumor lines. *Blood* **73**(4), 945–951
- Noseworthy JH (1999): Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* **399**(6738 Suppl), A40-7
- Noster R, Riedel R, Mashreghi M-F, Radbruch H, Harms L, Haftmann C, Chang H-D, Radbruch A, Zielinski CE (2014): IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Sci Transl Med* **6**(241), 241ra80
- O’Gorman C, Lucas R, Taylor B (2012): Environmental risk factors for multiple sclerosis: a review with a focus on molecular mechanisms. *Int J Mol Sci* **13**(12), 11718–11752
- Obermeier B, Mentele R, Malotka J, Kellermann J, Kümpfel T, Wekerle H, Lottspeich F, Hohlfeld R, Dornmair K (2008): Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nat Med* **14**(6), 688–693

- O'Donovan M (2003): Infection and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **74**(5), 693
- Otsuka T, Miyajima A, Brown N, Otsu K, Abrams J, Saeland S, Caux C, Waal Malefijt R de, Vries J de, Meyerson P (1988): Isolation and characterization of an expressible cDNA encoding human IL-3. Induction of IL-3 mRNA in human T cell clones. *J Immunol* **140**(7), 2288–2295
- Owens GP, Bennett JL, Lassmann H, O'Connor KC, Ritchie AM, Shearer A, Lam C, Yu X, Birlea M, DuPree C et al. (2009): Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* **65**(6), 639–649
- Pachner AR (2011): Experimental models of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* **24**(3), 291–299
- Palaszynski EW, Ihle JN (1984): Evidence for specific receptors for interleukin 3 on lymphokine-dependent cell lines established from long-term bone marrow cultures. *J Immunol* **132**(4), 1872–1878
- Panousis C, Dhagat U, Edwards KM, Rayzman V, Hardy MP, Braley H, Gauvreau GM, Hercus TR, Smith S, Sehmi R (2015): CSL311, a novel, potent, therapeutic monoclonal antibody for the treatment of diseases mediated by the common β chain of the IL-3, GM-CSF and IL-5 receptors. *MAbs*, e1119352
- Papadopoulos D, Dukes S, Patel R, Nicholas R, Vora A, Reynolds R (2009): Substantial archaeocortical atrophy and neuronal loss in multiple sclerosis. *Brain Pathol* **19**(2), 238–253
- Park LS, Friend D, Gillis S, Urdal DL (1986): Characterization of the cell surface receptor for a multi-lineage colony-stimulating factor (CSF-2 alpha). *J Biol Chem* **261**(1), 205–210
- Park LS, Friend D, Price V, Anderson D, Singer J, Prickett KS, Urdal DL (1989): Heterogeneity in human interleukin-3 receptors. A subclass that binds human granulocyte/macrophage colony stimulating factor. *J Biol Chem* **264**(10), 5420–5427
- Paterson PY (1960): Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J Exp Med* **111**, 119–136
- Pawate S, Bagnato F (2015): Newer agents in the treatment of multiple sclerosis. *Neurologist* **19**(4), 104–117
- Perron H, Geny C, Laurent A, Mouriquand C, Pellat J, Perret J, Seigneurin JM (1989): Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Res Virol* **140**(6), 551–561
- Perron H, Lalande B, Gratacap B, Laurent A, Genoulaz O, Geny C, Mallaret M, Schuller E, Stoebner P, Seigneurin JM (1991): Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet* **337**(8745), 862–863
- Peterson JW, Bö L, Mörk S, Chang A, Trapp BD (2001): Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* **50**(3), 389–400
- Pette M, Fujita K, Wilkinson D, Altmann DM, Trowsdale J, Giegerich G, Hinkkanen A, Eppelen JT, Kappos L, Wekerle H (1990): Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(20), 7968–7972
- Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley-Hyde J, Nordan RP, Paul WE (1989): Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature* **339**(6219), 64–67
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* **69**(2), 292–302
- Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Pedras-Vasconcelos J, Verthelyi D, Dittel BN (2006): 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**(1), 39–48

- Ponsonby A-L (2005): Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 293(4), 463
- Popescu BFG, Bunyan RF, Parisi JE, Ransohoff RM, Lucchinetti CF (2011): A case of multiple sclerosis presenting with inflammatory cortical demyelination. *Neurology* 76(20), 1705–1710
- Powell HC, Garrett RS, Brett FM, Chiang CS, Chen E, Masliah E, Campbell IL (1999): Response of glia, mast cells and the blood brain barrier, in transgenic mice expressing interleukin-3 in astrocytes, an experimental model for CNS demyelination. *Brain Pathol* 9(2), 219–235
- Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR, Barnett MH, Oleszak EL, Hoffman B, Morgan BP (2001): Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50(5), 646–657
- Procaccini C, Rosa V de, Pucino V, Formisano L, Matarese G (2015): Animal models of multiple sclerosis. *Eur J Pharmacol* 759, 182-191
- Pucci E, Giuliani G, Solari A, Simi S, Minozzi S, Di Pietrantonj C, Galea I (2011): Natalizumab for relapsing remitting multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* (10), CD007621
- Ramgolam VS, Sha Y, Jin J, Zhang X, Markovic-Plese S (2009): IFN- β inhibits human Th17 cell differentiation. *J Immunol* 183(8), 5418–5427
- Ramos-Vara JA (2005): Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42(4), 405–426
- Rangachari M, Kuchroo VK (2013): Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *J Autoimmun* 45, 31–39
- Rasminsky M, terBrugge K (2013): Goodbye to all that: a short history of CCSVI. *Mult Scler* 19(11), 1425–1427
- Rasmussen HB, Geny C, Deforges L, Perron H, Tourtelotte W, Heltberg A, Clausen J (1997): Expression of endogenous retroviruses in blood mononuclear cells and brain tissue from multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand Suppl* 169, 38–44
- Rasouli J, Ciric B, Imitola J, Gonnella P, Hwang D, Mahajan K, Mari ER, Safavi F, Leist TP, Zhang G-X (2015): Expression of GM-CSF in T cells is increased in multiple sclerosis and suppressed by IFN- β therapy. *J Immunol* 194(11), 5085–5093
- Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F (2009): C-C chemokine receptor 6–regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 10(5), 514–523
- Recks MS, Addicks K, Kuerten S (2011): Spinal cord histopathology of MOG peptide 35–55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis is time- and score-dependent. *Neurosci Lett* 494(3), 227–231
- Riise T, Nortvedt MW, Ascherio A (2003): Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology* 61(8), 1122–1124
- Rivers TM, Schwentker FF (1935): Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med* 61(5), 689–702
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933): Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* 58(1), 39–53
- Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD (2014): The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol* 122, 173–189
- Roche Group Media Relations (2016): FDA verlängert Prüfungszeitraum für den Zulassungsantrag von OCREVUS™ (Ocrelizumab). <http://www.roche.com/dam/jcr:c5219896-e69f-4233-a319-e32d57a1cf93/de/med-cor-2016-12-20-d.pdf>; Zugriff am 19.01.2017
- Rodriguez M, Scheithauer B (1994): Ultrastructure of multiple sclerosis. *Ultrastruct Pathol* 18(1–2), 3–13

- Romeis – Mikroskopische Technik. Hrsg. v. Mulisch M, Welsch U. 18. Auflage (Kindle Edition); Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010
- Rook GAW (2012): Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 42(1), 5–15
- Rothenberg ME, Owen WF, Silberstein DS, Woods J, Soberman RJ, Austen KF, Stevens RL (1988): Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J Clin Invest* 81(6), 1986–1992
- Roulis E, Polkinghorne A, Timms P (2013): Chlamydia pneumoniae: modern insights into an ancient pathogen. *Trends Microbiol* 21(3), 120–128
- Rozenberg F, Lefebvre S, Lubetzki C, Lebon P, Lyon-Caen O, Brahic M, Bureau JF (1991): Analysis of retroviral sequences in the spinal form of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 29(3), 333–336
- Rubin SM (2013): Management of multiple sclerosis: an overview. *Dis Mon* 59(7), 253–260
- Sakamaki K, Miyajima I, Kitamura T, Miyajima A (1992): Critical cytoplasmic domains of the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors for growth signal transduction and tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 11(10), 3541–3549
- Salzer J, Hallmans G, Nystrom M, Stenlund H, Wadell G, Sundstrom P (2013): Smoking as a risk factor for multiple sclerosis. *Mult Scler* 19(8), 1022–1027
- Sato N, Sakamaki K, Terada N, Arai K, Miyajima A (1993): Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible for different signaling. *EMBO J* 12(11), 4181–4189
- Scannevin RH, Chollate S, Jung M-y, Shackett M, Patel H, Bista P, Zeng W, Ryan S, Yamamoto M, Lukashev M (2012): Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 341(1), 274–284
- Schilling S, Linker RA, König FB, Koziolok M, Bähr M, Müller GA, Paulus W, Gärtner J, Brück W, Chan A (2006): Plasmaaustausch bei steroidresistenten Multiple-Sklerose-Schüben. *Nervenarzt* 77(4), 430–438
- Schroeder JT, Chichester KL, Bieneman AP (2009): Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease. *J Immunol* 182(4), 2432–2438
- Schweiger A, Stern D, Lohman IC, Baldini M, Martinez FD, Halonen M (2001): Differences in proliferation of the hematopoietic cell line TF-1 and cytokine production by peripheral blood leukocytes induced by 2 naturally occurring forms of human IL-3. *J Allergy Clin Immunol* 107(3), 505–510
- Segal BM, Shevach EM (1996): IL-12 unmasks latent autoimmune disease in resistant mice. *J Exp Med* 184(2), 771–775
- Serada S, Fujimoto M, Mihara M, Koike N, Ohsugi Y, Nomura S, Yoshida H, Nishikawa T, Terabe F, Ohkawara T (2008): IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(26), 9041–9046
- Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F (2004): Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 14(2), 164–174
- Shen T, Kim S, Do J-s, Wang L, Lantz C, Urban JF, Le Gros G, Min B (2008): T cell-derived IL-3 plays key role in parasite infection-induced basophil production but is dispensable for in vivo basophil survival. *Int Immunol* 20(9), 1201–1209
- Sheng W, Yang F, Zhou Y, Yang H, Low PY, Kemeny DM, Tan P, Moh A, Kaplan MH, Zhang Y et al. (2014): STAT5 programs a distinct subset of GM-CSF-producing T helper cells that is essential for autoimmune neuroinflammation. *Cell Res* 24(12), 1387–1402

- Sie C, Korn T, Mitsdoerffer M (2014): Th17 cells in central nervous system autoimmunity. *Exp Neurol* 262(Pt A), 18–27
- Singh AV, Zamboni P (2009): Anomalous venous blood flow and iron deposition in multiple sclerosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 29(12), 1867–1878
- Sobel RA, Greer JM, Kuchroo VK (1994): Minireview: autoimmune responses to myelin proteolipid protein. *Neurochem Res* 19(8), 915–921
- Sobocki P, Pugliatti M, Lauer K, Kobelt G (2007): Estimation of the cost of MS in Europe: Extrapolations from a multinational cost study. *Mult Scler* 13(8), 1054–1064
- Sotgiu S, Piana A, Pugliatti M, Sotgiu A, Deiana GA, Sgaramella E, Muresu E, Rosati G (2001): Chlamydia pneumoniae in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and neurological controls. *Mult Scler* 7(6), 371–374
- Spiegl N, Didichenko S, McCaffery P, Langen H, Dahinden CA (2008): Human basophils activated by mast cell-derived IL-3 express retinaldehyde dehydrogenase-II and produce the immunoregulatory mediator retinoic acid. *Blood* 112(9), 3762–3771
- Spielman RS, Nathanson N (1982): The genetics of susceptibility to multiple sclerosis. *Epidemiol Rev* 4, 45–65
- Sriram S, Steiner I (2005): Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 58(6), 939–945
- Sriram S, Solomon D, Rouse RV, Steinman L (1982): Identification of T cell subsets and B lymphocytes in mouse brain experimental allergic encephalitis lesions. *J Immunol* 129(4), 1649–1651
- Sriram S, Mitchell W, Stratton C (1998): Multiple sclerosis associated with Chlamydia pneumoniae infection of the CNS. *Neurology* 50(2), 571–572
- Sriram S, Stratton CW, Yao S, Tharp A, Ding L, Bannan JD, Mitchell WM (1999): Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 46(1), 6–14
- Stadelmann C, Wegner C, Brück W (2011): Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology. *Biochim Biophys Acta* 1812(2), 275–282
- Stefano S, Maura P, Alessandra S, Alessandra S, Giulio R (2003): Does the “hygiene hypothesis” provide an explanation for the high prevalence of multiple sclerosis in Sardinia? *Autoimmunity* 36(5), 257–260
- Steinman L (1996): A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: a tale of smart bombs and the infantry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6), 2253–2256
- Steinman L (2007): A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13(2), 139–145
- Steinman L, Zamvil SS (2006): How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 60(1), 12–21
- Stewart GJ (2002): Infection and multiple sclerosis--a new hypothesis? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73(4), 358-a-359
- Storch M, Lassmann H (1997): Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases. *Curr Opin Neurol* 10(3), 186–192
- Storozynsky E, Woodward JG, Frelinger JG, Lord EM (1999): Interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhance the generation and function of dendritic cells. *Immunology* 97(1), 138–149
- Stromnes IM, Goverman JM (2006): Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1(4), 1810–1819

- Stuart G, Krikorian K (1930): A fatal neuro-paralytic accident of antirabies treatment. *Lancet* 215(5569), 1123–1125
- Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, Geurts JJG (2012): Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci* 13(7), 507–514
- Sugita Y, Zhao B, Shankar P, Dunbar CE, Doren S, Young HA, Schwartz JP (1999): CNS interleukin-3 (IL-3) expression and neurological syndrome in antisense-IL-3 transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 58(5), 480–488
- Sutherland JM, Tyrer JH, Eadie MJ (1962): The prevalence of multiple sclerosis in Australia. *Brain* 85, 149–164
- Svetić A, Madden KB, Zhou XD, Lu P, Katona IM, Finkelman FD, Urban JF, Gause WC (1993): A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. *J Immunol* 150(8 Pt 1), 3434–3441
- Tavernier J, Devos R, Cornelis S, Tuypens T, van der Heyden J, Fiers W, Plaetinck G (1991): A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific α chain and a β chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell* 66(6), 1175–1184
- The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) (2010): Evidence for polygenic susceptibility to multiple sclerosis – the shape of things to come. *Am J Hum Genet* 86(4), 621–625
- Traka M, Podojil JR, McCarthy DP, Miller SD, Popko B (2016): Oligodendrocyte death results in immune-mediated CNS demyelination. *Nat Neurosci* 19(1), 65–74
- Trapp BD, Nave K-A (2008): Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* 31, 247–269
- Tsvigoulis G, Sergentanis TN, Chan A, Voumvourakis K, Triantafyllou N, Psaltopoulou T, Gold R, Krogias C (2014): Chronic cerebrospinal venous insufficiency and multiple sclerosis: a comprehensive meta-analysis of case-control studies. *Ther Adv Neurol Disord* 7(2), 114–136
- Tsunoda I, Kuang LQ, Theil DJ, Fujinami RS (2000): Antibody association with a novel model for primary progressive multiple sclerosis: induction of relapsing-remitting and progressive forms of EAE in H2s mouse strains. *Brain Pathol* 10(3), 402–418
- Tullman M, Oshinsky R, Lublin F, Cutter G (2004): Clinical characteristics of progressive relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler* 10(4), 451–454
- 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(1), 146–155
- Van der Star JB, Vogel DYS, Kipp M, Puentes F, Baker D, Amor S (2012): In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11(5), 570–588
- Van der Veen RC, Stohlman SA (1993): Encephalitogenic Th1 cells are inhibited by Th2 cells with related peptide specificity: relative roles of interleukin (IL)-4 and IL-10. *J Neuroimmunol* 48(2), 213–220
- Van Leeuwen BH, Martinson ME, Webb GC, Young IG (1989): Molecular organization of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF genes, on human chromosome 5. *Blood* 73(5), 1142–1148
- Walker F, Nicola NA, Metcalf D, Burgess AW (1985): Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors. *Cell* 43(1), 269–276
- Walsh MJ, Tourtellotte WW, Roman J, Dreyer W (1985): Immunoglobulin G, A, and M--clonal restriction in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum--analysis by two-dimensional electrophoresis. *Clin Immunol Immunopathol* 35(3), 313–327
- Weber GF, Chousterman BG, He S, Fenn AM, Nairz M, Anzai A, Brenner T, Uhle F, Iwamoto Y, Robbins CS (2015): Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science* 347(6227), 1260–1265

- Weber MS, Prod'homme T, Patarroyo JC, Molnarfi N, Karnezis T, Lehmann-Horn K, Danilenko DM, Eastham-Anderson J, Slavin AJ, Linington C (2010): B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol* 68(3), 369–383
- Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, Noseworthy JH, Lucchinetti CF, Dodick DW, Pineda AA, Stevens LN, Rodriguez M (1999): A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol* 46(6), 878–886
- Weinstock-Guttman B (2013): An update on new and emerging therapies for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Am J Manag Care* 19(17 Suppl), s343-54
- Wiendl H, Hohlfeld R (2009): Multiple sclerosis therapeutics: unexpected outcomes clouding undisputed successes. *Neurology* 72(11), 1008–1015
- Wimperis JZ, Niemeyer CM, Sieff CA, Mathey-Prevot B, Nathan DG, Arceci RJ (1989): Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 mRNAs are produced by a small fraction of blood mononuclear cells. *Blood* 74(5), 1525–1530
- Wodnar-Filipowicz A, Heusser CH, Moroni C (1989): Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature* 339(6220), 150–152
- Wolf A, Kabat EA, Bezer AE (1947): The pathology of acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in the rhesus monkey and its resemblance to human demyelinating disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 6(4), 333–357
- Wolswijk G (2002): Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord. *Brain* 125(Pt 2), 338–349
- Yang YC, Ciarletta AB, Temple PA, Chung MP, Kovacic S, Witek-Giannotti JS, Leary AC, Kriz R, Donahue RE, Wong GG (1986): Human IL-3 (multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell* 47(1), 3–10
- Yang YC, Clark SC: Molecular cloning of a primate cDNA and the human gene for Interleukin 3. In: Schrader JW (Hrsg.): *Interleukin 3: The panspecific hemopoitin*. Lymphokines Bd. 15. Academic Press/Elsevier, San Diego u.a. 1988, 375–391
- Yao S, Young IG, Norton RS, Murphy JM (2011): Murine Interleukin-3: Structure, Dynamics, and Conformational Heterogeneity in Solution. *Biochemistry* 50(13), 2464–2477
- Yao SY, Stratton CW, Mitchell WM, Sriram S (2001): CSF oligoclonal bands in MS include antibodies against Chlamydomophila antigens. *Neurology* 56(9), 1168–1176
- Yokota T, Lee F, Rennick D, Hall C, Arai N, Mosmann T, Nabel G, Cantor H, Arai K (1984): Isolation and characterization of a mouse cDNA clone that expresses mast-cell growth-factor activity in monkey cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(4), 1070–1074
- York NR, Mendoza JP, Ortega SB, Benagh A, Tyler AF, Firan M, Karandikar NJ (2010): Immune regulatory CNS-reactive CD8+T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 35(1), 33–44
- Yoshimura-Uchiyama C, Yamaguchi M, Nagase H, Matsushima K, Igarashi T, Iwata T, Yamamoto K, Hirai K (2003): Changing expression of IL-3 and IL-5 receptors in cultured human eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 309(1) 26–31
- Zamboni P (2006): The big idea: iron-dependent inflammation in venous disease and proposed parallels in multiple sclerosis. *J R Soc Med* 99(11), 589–593
- Zamboni P, Galeotti R, Menegatti E, Malagoni AM, Tacconi G, Dall'Ara S, Bartolomei I, Salvi F (2008): Chronic cerebrospinal venous insufficiency in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80(4), 392–399
- Zamvil S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, Steinman L (1985): T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 317(6035), 355–358

Zhao B, Schwartz JP (1998): Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. *J Neurosci Res* 52(1), 7–16

Zhao ML, Xia JQ, Fritz RB (1993): Interleukin-3 and encephalitogenic activity of SJL/J myelin basic protein-specific T cell lines. *J Neuroimmunol* 43(1–2), 69–78

Zivadinov R, Weinstock-Guttman B (2013): Funding CCSVI research is/was a waste of valuable time, money and intellectual energy: no. *Mult Scler* 19(7), 858–860

Lebenslauf

Mein Name ist Benjamin Saß, ich wurde am 05.07.1982 in Kiel geboren. Ich bin seit dem 13.09.2014 verheiratet.

Von 1989 bis 1993 habe ich die Grundschule Flintbek besucht, im Anschluss bis 2003 die Humboldt-Schule Kiel, an der ich mein Abitur machte. Das Schuljahr 1999/2000 habe ich als Gastschüler an der Underwood High School, Underwood, Minnesota, USA, verbracht.

Nach einem mehrmonatigen Aufenthalt in Ghana habe ich mich entschieden, Humanmedizin zu studieren. Im Sommersemester 2004 habe ich mein Studium an der Justus-Liebig-Universität Gießen aufgenommen. Den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung habe ich im März 2006 bestanden (Note: 2,5). Im April 2010 konnte ich dann den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note 1,5 abschließen.

Bereits während des Studiums habe ich ein besonderes Interesse für neurologische Fragestellungen entwickelt und famulierte im September 2008 in der Neurologie des Klinikums Bayreuth (Betriebsstätte Hohe Warte). Im Frühjahr 2009 absolvierte ich mein Wahltertial des Praktischen Jahres in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen. Die weiteren Tertiale verbrachte ich in der Schweiz als Unterassistent in der Chirurgie des Kantonsspitals Liestal und in der Inneren Medizin des kantonalen Spitals Altstätten.

Nach dem Studium arbeitete ich von September 2010 bis Januar 2017 als Weiterbildungsassistent in der Klinik für Neurochirurgie in den Asklepios Kliniken Schildautal Seesen. Im November 2016 habe ich die Facharztprüfung für Neurochirurgie erfolgreich abgelegt. Neben meiner Tätigkeit in Seesen begann ich im September 2013 meine Promotion mit dem Titel „Der Einfluss von Interleukin-3 auf die Läsionslast der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis“ am Institut für Neuropathologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen.

Seit Februar 2017 arbeite ich als Facharzt in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg.

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler, Stellvertretende Direktorin des Instituts für Neuropathologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen, für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die stets freundliche und hilfreiche Betreuung.

Prof. Dr. med. W. Brück, Direktor des Instituts für Neuropathologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen, danke ich zum einen für die Möglichkeit, am Institut für Neuropathologie promovieren zu dürfen, zum anderen für die Vermittlung des Dissertationsthemas.

Prof. Dr. M. Mack sowie Dr. med. K. Renner, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II am Klinikum der Universität Regensburg, danke ich für die gute Kooperation.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Institutsmitarbeitern der Neuropathologie für die angenehme Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken. Ausdrücklich hervorheben möchte ich hier Katja Schulz, die mich geduldig in die Laborabläufe eingewiesen hat und bei Fragen jeglicher Art immer zu helfen wusste.