Pathomechanismen der sporadischen Einschlusskörperchenmyositis: molekulare Interaktionen zwischen entzündlichem und β-Amyloid-assoziiertem Zellstress im Muskel

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
"Doctor rerum naturalium"

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von Konstanze Barthel

aus Nordhausen Göttingen 2009

Referentin: Frau Prof. Dr. S. Hoyer-Fender

Korreferent: Herr Prof. Dr. D. Doenecke

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	
П	Abkürzungsverzeichnis	V
Ш	Abbildungsverzeichnis	X
IV	Tabellenverzeichnis	XIV
1.	Einleitung	1
1.1	Histopathologie der sporadischen Einschlusskörperchenmyositis	2
1.2	Pathomechanismen der sIBM	4
1.2.1	Entzündliche Pathomechanismen bei der sIBM	5
1.2.1.	1 Induktion der Immunantwort: die Rolle von MHC-I und CD8 ⁺ T-Zellen	5
1.2.1.	2 Die Rolle von Zytokinen und Chemokinen	6
1.2.2	Degenerative Pathomechanismen bei der sIBM	7
1.2.2.	1 Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP), dessen Prozessierung und eta -	8
	Amyloid	
	Abnormalitäten bei der APP Prozessierung und deren Regulierung	11
1.2.2.2 Andere Degenerations-und Zellstress-assoziierte Proteine		12
	Phosphoryliertes Tau (p-Tau)	12
	αB-Crystallin und andere Hitzeschockproteine	12
1.2.2.3	3 Oxidativer Zellstress	12
1.2.2.4	4 Zelltodmechanismen bei der sIBM	14
1.3	Ziel der Arbeit	16
2.	Material	18
2.1	Geräte	18
2.2	Chemikalien	19
2.3	Labormaterialien	20
2.4	Lösungen und Puffer	21
2.5	Medien	24
2.5.1	Medien für die Zellkultur	24
2.6	Zelllinien, Bakterienstämme, Plasmide und siRNA	25
2.6.1	Zelllinien	25
2.6.2	Bakterienstämme	25
2.6.3	Plasmide	26
2.6.4	siRNA	26
2.7	Antikörper, Farbstoffe, Inhibitoren, Zytokine und Seren	26

INHALTSVERZEICHNIS II

2.8	Längenstandards	28
2.8.1	Längenstandards für das Immunoblotting	28
2.8.2	Längenstandards bei der Agarose-Gelelektrophorese von DNA	28
2.9	Restriktionsenzyme und Antibiotika	28
2.9.1	Restriktionsenzyme	28
2.9.2	Antibiotika	28
2.9.2.1	Ampicillin	28
2.9.2.2	Penicillin	28
2.9.2.3	Streptomycin	28
2.10	Kits	29
2.10.1	RNAesy Kit	29
2.10.2	Jetstar Kit	29
2.11	Primer-Proben für die RT-PCR	29
2.11.1	selbst entwickelte Oligodesoxyribonukleotide als Primer zur Real-Time	
	PCR von MHC-I	29
2.11.2	Primer - Proben für die Real-Time PCR	29
2.12	Software	30
3.	Methoden	31
3.1	Zellbiologische Methoden	31
3.1.1	Allgemeine Hinweise zum Arbeiten mit Zellkulturen	31
3.1.2	Kultivierung von adhärenten Zellen	31
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	31
3.1.4	Gefrierkonservierung von eukaryotischen Zellen	32
3.1.5	Auftauen von Zellen	32
3.1.6	Generierung von Primärmuskelzellkulturen	32
3.1.6.1	Initiale Preparation des Muskels	32
3.1.6.2	Myoblastenwachstum und Sub-Kultivierung	33
3.1.7	Kultivierung von Myoblasten und Myotuben auf Platten / Chamberslides	34
3.1.8	Exposition von Myoblasten und Myotuben mit pro-inflammatorischen	
	Zytokinen	34
3.1.9	Exposition von Myoblasten und Myotuben mit Inhibitoren	34
3.1.10	Vorbereitung der Kammer-Objektträger für immunzytochemische	
	Färbungen	35
3.2	Immunbiologische Methoden	36
3.2.1	Aufreinigung von NCAM ⁺ (CD56 ⁺) Myoblasten (Muskelvorläuferzellen /	
	Satellitenzellen) mittels MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting)	36

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.2	Messung fluoreszenz markierter Zellen / Durchflusszytometrie	36
3.2.2.1	Markierung der Zellen mit DAF-2 DA / DCF-DA und Zelltodfärbung mit	
	7AAD und AnnexinV-APC	37
3.2.2.2	Markierung der Zellen für Zelltodbestimmungen mittels 7AAD und	
	AnnexinV-APC	38
3.2.2.3	Markierung der Zellen für MHC-I Messung	38
3.2.3	Immunzytochemische Färbung	38
	ThioflavinS	39
	Propidiumiodid (PI)	39
	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	40
3.2.3	Zelllyse zur Proteingewinnung für den Westernblot	41
3.2.3.1	Gewinnung von zytosolischen Proteinen	41
3.2.3.2	Gewinnung von membranständigen Proteinen	41
	mittels Urea-Puffer	41
	Membranproteinextraktion mit Hypoton-Puffer	42
3.2.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	42
3.2.5	Auftrennung von Proteinen über SDS-Gelelektrophorese	42
3.2.6	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	43
3.2.7	Ponceau S-Färbung der Nitrocellulosemembran	44
3.2.8	Immunchemischer Nachweis der Proteine	44
3.2.9	Auftrennung von Proteinen über Tris-Tricin-Gelelektrophorese	44
3.2.10	Wiederherstellen (Strippen) von Nitrozellulosemembranen	45
3.2.11	Densitometrische Auswertung	45
3.2.12	Immunpräzipitation	46
3.3	Molekularbiologische Methoden	46
3.3.1	RNA-Extraktion aus humanen Myoblasten und humanen	
	Primärmyotubenkulturen	46
3.3.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	47
3.3.3	cDNA-Synthese / reverse Transkription	47
3.3.4	Real-Time-PCR	47
3.3.5	Transfektion eukaryotischer Zellen	48
3.3.5.1	Plasmid-Transfektion mit Nanofectin	48
3.3.5.2	Transfektion von Myoblasten und Myotuben mit Small interfering	
	(si)RNAs zum knock-down von Genen	49
3.3.6	Adenovirale Infektion eukaryotischer Zellen	49
3.3.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli	51
3.3.8.1	Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-und Maxi-Preparation)	51

INHALTSVERZEICHNIS

4. Er	gebnisse	52
4.1	Generierung eines in vitro Modells für entzündlichen Zellstress	
	im Muskel	52
4.1.1	Entzündliche Signalkaskaden nach Exposition der Myotubenkulturen mit	
	pro-inflammatorischen Zytokinen	53
4.1.2	Überexpression von MHC-I nach Exposition von Myotubenkulturen mit	
	pro-inflammatorischen Zytokine	54
4.1.3	Proteinakkumulationen von β-Amyloid-assoziierten Molekülen nach	
	Exposition von Myotubenkulturen mit pro-inflammatorischen Zytokinen	57
4.1.4	Analyse der Expression von αB-Crystallin und phosphoryliertem Tau /	
	Neurofilament nach Exposition von Myotubenkulturen mit pro-	
	inflammatorischen Zytokinen	60
4.2	NO-assoziierter Zellstress unter pro-inflammatorischen Bedingungen	62
4.1.4	Immunzytochemische Analyse von NO-Stress	63
4.2.2	Durchflusszytrometrische Analyse der ROS- und NO-Produktion	64
4.2.3	Inhibition der NO Produktion	66
4.2.4	Zelltoduntersuchungen unter pro-inflammatorischen Bedingungen	69
4.3	Die Rolle von BACE1 für die Akkumulation von β-Amyloid unter	
	entzündlichen Bedingungen	75
4.3.1	Expression von BACE1 unter entzündlichen Bedingungen	75
4.3.2	siRNA vermittelter knock-down von BACE1	76
4.3.2.1	1 Transfektion von Myoblasten und Myotuben mit siGLO	77
4.3.2.2	2 Analyse der BACE1 knock-down Effizienz	78
4.3.2.3	3 Analyse der APP-Prozessierung nach BACE1 knock-down	81
4.3.2.4	4 Analyse der Expression von entzündlichen und degenerativen Markern	
	nach BACE1 knock-down	83
4.3.2.5	5 Zelltodanalyse nach BACE1 <i>knock-down</i> unter pro-inflammatorischen	
	Bedingungen	88
4.3.3	pharmakologische Inhibition von BACE1	89
4.3.3.	1 Analyse der APP-Prozessierung nach BACE1-Inhibition	89
4.3.3.2	2 Analyse der Expression von entzündlichen und degenerativen Markern	
	nach BACE1-Inhibition	90
4.3.3.3	3 Zelltodanalyse nach BACE1-Inhibition unter pro-inflammatorischen	
	Bedingungen	90
4.4	Einfluss der Überexpression von APP auf entzündlichen und	
	degenerativen Zellstress	90

Inhaltsverzeichnis

4.4.1	Analyse der Expression von Degenerations- und Entzündungs-	
	assoziierten Markern mittels RT-PCR	93
4.4.2	Immunzytochemische Analyse der Expression von Degenerations-	
	assoziierten Markern	95
4.5	In vitro Analyse des pro-inflammatorischen Zellstresses bei der sIBM	
	im Vergleich mit anderen Myopathien, ALS / Neuropathien und nicht-	
	pathologischen Kontrollen	98
4.5.1	Analyse der basalen in vitro Expression von entzündlichen und	
	degenerativen Markern bei der sIBM, anderen Myopathien, ALS /	
	Neuropathien und nicht-pathologischen Kontrollen	99
4.5.2		
	mit pro-inflammatorischen Zytokinen mittels RT-PCR	101
4.5.3	Immunzytochemische Analyse entzündlicher und Degenerations-	400
	assoziierter Marker unter pro-inflammatorischen Bedingungen	103
5. D	iskussion	109
5.1	Charakterisierung des in vitro Modells für entzündlichen Zellstress	
	im Muskel	109
5.2	Die Rolle von iNOS bei der Pathogenese der sIBM in vitro	115
5.3	Die entzündungsbedingte BACE1 Überexpression als Auslöser	
	muskulärer Degeneration in vitro	117
5.4	Einfluss der APP Überexpression auf entzündliche und degenerative	
	Pathomechanismen in vitro	120
5.5	Suszeptibilität primärer sIBM-Myotubenkulturen gegenüber	
	entzündlichen Zellstress	122
6.	Zusammenfassung	127
7.	Ausblick	129
8.	Literaturverzeichnis	130
9.	Danksagung	147

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VI

II Abkürzungsverzeichnis

% Prozent
× mal
α alpha
A Ampere
Abb. Abbildung

ABTS 2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonat
AD Alzheimer's disease, Morbus Alzheimer
AICD intracellular domain fragment of APP

AK Antikörper

ALS Amyotrophe Lateralsklerose

Amp Ampicillin

ApoE Apolipoprotein E

APP Amyloid-Vorläuferprotein

APPS lösliches Amyloid-Vorläuferprotein

AS Aminosäure

ATP Adenosintriphosphat

β beta

BACE1 beta-site of APP-cleaving enzyme, β-Sekretase

BSA Rinderserumalbumin bzw. beziehungsweise c Konzentration

ca. circa

CCR5 CC-Chemokinrezeptor 5
CD Cluster of Differentiation
cDNA complementary DNA

cm Zentimeter

CO₂ Kohlenstoffdioxid

COX Cytochrom C Oxidase

CTF Carboxyterminales Fragment

CXCL CXC-Ligand d destilliert

DM Dermatomyositis

DMEM Dulbecco`s Modified Eagle Medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

dNTP 3'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat

Abkürzungsverzeichnis VII

dsRNA doppelsträngige RNA

dT Desoxythymidin
DTT Dithiothreitol

ECL enhanced chemoluminescence
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
ER Endoplasmatisches Retikulum

et al. et alteri (und andere)

etc. *et cetera*EtOH Ethanol

FACS Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter (Durchflusszytometer)

FCS fetal calf serum (fötales Kälberserum)

FITC Fluoreszenzisothiocyanat

FSC forward scatter (Vorwärtsstreulicht)

γ gamma

g Zentralbeschleunigung, Gramm

GAPDH Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GFLD growth factor-like domain
GFP green fluorescence protein

GuaHCl Guanidin-Salzsäure

h Stunde H_20 Wasser

hIBM hereditäre IBM

HLA humanes Leukozytensystem

HRP horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase

HSP Hitzeschockprotein

ICAM-1 intracellular adhesion molecule-1

ICOS Inducible CO-stimulator

IFN Interferon

lg Immunglobulin

IgG Immunglobulin der Klasse G

IL Interleukin

iNOS induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase

IP Immunpräzipitation

IP10 interferon-gamma-induciple protein-10

IVIG intravenöse Immunglobuline

kb Kilobasen kDa Kilo-Dalton ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VIII

I Liter

L-NAME NG-Nitro-L-Arginin-Methylester

L-NMMA NG-Monomethyl-L-Arginin

Lsg. Lösung µ Mikro

m Meter, Milli

M Molar, Molekulargewichtsmarker
MACS magnetic-activated cell sorting

mAk monoklonaler Antikörper
MCK *muscle creatin kinase*

MCP-1 Monocyte chemoattractant protein-1
MHC-I major histocompatibility complex I

Min Minuten

mind. mindestens

MIP-1α Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha

ml Milliliter

µl Mikroliter

µm Mikrometer

mm Millimeter

mM Millimol

MMP Matrix-Metalloproteinasen
MNL Mononukleäre Leukozyten

mRNA messenger RNA

mtDNA mitochondriale DNA

MW Mittelwert μM Mikromol

n Anzahl der Messwerte

NaAc Natrium-Acetat

NADPH reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NADP

NC Nitrocellulose

NCAM Neural cell adhesion molecule, CD56

NFkB nuklear factor kappaB

ng Nanogramm
NK Negativkontrolle

nm Nanometer nM Nanomol ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IX

nNOS neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase

NO Stickstoffmonoxid

NOS Stickstoffmonoxid-Synthase

pAk polyklonaler Antikörper

PBS phosphate buffered saline

(Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)

PCR polymerase-chain reaktion (Polymerase-Kettenreaktion)

PE Phycoerythrin pers. persöhnlich

pfu plaque forming unit

pH negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

PHFs paired helical filaments

PI Propidiumiodid
PM Polymyositis
PS Presenilin

RISC RNA-induced silencing complex

RNA Ribonukleinsäure RNAi RNA *interference*

Rox Carboxy-X-Rhodamin
RT Reverse Transkriptase

RT-PCR Real-Time-PCR

SD Standardabweichung
SDS Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Sek Sekunde

sIBM sporadische Einschlusskörperchenmyositis

siRNA small interfering RNA SOD1 Superoxiddismutase 1

SSC Side light Scatter (Seitwärtsstreulicht)

Tab. Tabelle

TEMED NNN'N'-Tetramethylethylendiamin

TGF transforming growth factor
TNF Tumor Nekrose Faktor

Tris Trishydroxymethylaminomethan
U Einheit (*units*) der Enzymkapazität

u.a. unter anderem

UBB Ubiquitin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS X

V Volt

VCAM Vascular Adhesion Molecule

WT Wildtyp

z.B. zum Beispiel

ZNS Zentrales Nervensystem

7-AAD 7-Aminoactinomycin

ABBILDUNGSVERZEICHNIS XI

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	sIBM Patient	1
Abbildung 2:	Trichromfärbung einer sIBM Muskelbiopsie	3
Abbildung 3:	Mögliches Zusammenspiel der Patomechanismen der	
	sIBM	4
Abbildung 4:	Prozessierung von APP	10
Abbildung 5:	Darstellung von Gewebekomponente des Muskels in vivo und	
	sein Zellkultursystem in vitro nach [Wiendl et al. 2005]	33
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des AdEasy Systems nach [He et al.	
	1998]	50
Abbildung 7:	Expression von CXCL-9 und IL-1β in nicht-pathologischen	
	Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen Bedingungen	54
Abbildung 8:	Nachweis der MHC-I Expression in nicht-patologischen	
	Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen Bedingungen	56
Abbildung 9:	Expression von APP in nicht-pathologischen Myotubenkulturen	
	unter pro-inflammatorischen Bedingungen	58
Abbildung 10:	Nachweis der Akkumulation und Aggregation von β-Amyloid in	
	nicht-patologischen Myotubenkulturen unter pro-	
	inflammatorischen Bedingungen	59
Abbildung 11:	Nachweis der zytokinbedingten Überexpression von	
	αB-Crystallin und phosphoryliertem Tau / Neurofilament	61
Abbildung 12:	Induktion von iNOS in nicht-pathologischen	
	Myotubenkulturen durch pro-inflammatorische Zytokine	63
Abbildung 13:	Immunzytochemischer Nachweis von Nitrotyrosin in nicht-	
	pathologischen Myotubenkulturen unter pro-	
	inflammatorischen Bedingungen	64
Abbildung 14:	Durchflusszytometrische Analyse der ROS-Produktion in	
	Myoblasten unter pro-inflammatorischen Bedingungen	65
Abbildung 15:	Durchflusszytometrische Analyse der NO-Produktion in	
	Myoblasten unter pro-inflammatorischen Bedingungen	66
Abbildung 16:	Inhibition von iNOS reduziert die NO-Produktion in humanen	
	Myoblasten unter pro-inflammatorischen Bedingungen	67
•	Durchflusszytometrische Untersuchung der NO-Produktion nach	
	Inhibition von iNOS in humanen Myoblasten	68
Abbildung 18:	Morphologische Untersuchung der Myoblasten nach	

Abbildungsverzeichnis

	Behandlung mit NO-Donor oder pro-inflammatorischen	
	Zytokinen	69
Abbildung 19:	Durchflusszytometrische Analyse von Zelltod und NO-	
	Produktion in humanen Myoblasten unter pro-	70
	inflammatorischen Bedingungen	
Abbildung 20:	Zelltodfärbung nach Inhibition von iNOS in nicht-pathologischen	
	Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen Bedingungen	71
Abbildung 21:	Durchflusszytometrische Zelltodanalyse	72
Abbildung 22:	Durchflusszytometrische Zelltodanalyse nach Caspaseinhibition	74
Abbildung 23:	Nachweis der BACE1-Induktion in vitro unter pro-	
	inflammatorischen Bedingungen	76
Abbildung 24:	Transfektion von Myoblasten und Myotuben mit siGLO-Green	
	siRNA in vitro	77
Abbildung 25:	BACE1 mRNA Expression nach knock down mit siRNA in vitro	78
Abbildung 26:	BACE1 mRNA Expression nach knock down in vitro unter pro-	
	inflammatorischen Bedingungen	79
Abbildung 27:	Expression von BACE1 nach knock down in nicht-	
	pathologischen Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen	
	Bedingungen	80
Abbildung 28:	Analyse der APP-Prozessierung nach knock-down von	
	BACE1 in nicht-pathologischen Myotubenkulturen unter pro-	
	inflammatorischen Bedingungen	82
Abbildung 29:	in vitro mRNA Expression Entzündungs- und Zellstress-	
	assoziierter Markern nach BACE1 knock-down	83
Abbildung 30:	Immunzytochemische Analyse der Expression von IL-1β,	
	CXCL-9 und MHC-I nach BACE1 knock-down unter pro-	
	inflammatorischen Bedingungen <i>in vitro</i>	85
Abbildung 31:	Immunzytochemische Analyse der Expression von αB-	
	Crystallin und phosphoryliertem Tau / Neurofilammetn nach	
	BACE1 knock-down unter pro-inflammatorischen Bedingungen	
	in vitro	86
Abbildung 32:	Immunzytochemische Analyse von NO-assoziiertem Zellstress	
	nach knock-down von BACE1 unter pro-inflammatorischen	
	Bedingungen in vitro	87
Abbildung 33:	Zytochemische Analyse des Zelltodes nach knock-down von	
	BACE1 unter pro-inflammatorischen Bedingungen in vitro	88
Abbildung 34:	Titrierung des BACE1-Inhibitors	89

Abbildungsverzeichnis XIII

Abbildung 35:	APP-mRNA Expression in adenoviral infizierten Myotuben	91
Abbildung 36:	Analyse der APP- und GFP- Expression in adenoviral infizierten	
	Myotuben in vitro	92
Abbildung 37:	Expression von APP und β-Amyloid in Myotuben nach	
	adenoviraler Infektion in vitro	93
Abbildung 38:	in vitro mRNA Expression Entzündungs- und Zellstress-	
	assoziierter Markern in Myotuben nach adenoviraler Infektion	95
Abbildung 39:	Analyse von Zellstress und Zelltod in Myotuben nach	
	adenoviraler Infektion in vitro	96
Abbildung 40:	Immunzytochemische Analyse der Expression αB-Crystallin	
	und phosphoryliertem Tau / Neurofilament in Myotuben nach	
	adenoviraler Infektion	97
Abbildung 41:	Immunzytochemische Analyse der Expression von iNOS und	
	BACE1 in Myotuben nach adenoviraler Infektion	98
Abbildung 42:	in vitro Analyse der basalen mRNA Expression von	
	Entzündungs- und Degenerations-assoziierten Markern in	
	primären Myotubenkulturen	100
Abbildung 43:	in vitro Analyse der basalen Protein-Expression von	
	Entzündungs- und Degenerations-assoziierten Markern in	
	primären Myotubenkulture	101
Abbildung 44:	Analyse der mRNA Expression von Entzündungs- und	
	Degenerations-assoziierten Markern unter pro-	
	inflammatorischen Bedingungen	103
Abbildung 45:	Immunzytochemische Analyse der CXCL-9, IL-1β und MHC-I	
	Expression	105
Abbildung 46:	Immunzytochemische Analyse der APP und β-Amyloid	
	Expression	106
Abbildung 47:	Immunzytochemische Analyse der Expression von αB-	
	Crystallin, phosphoryliertem Tau / Neurofilament, iNOS und	
	Nitrotyrosin	108

TABELLENVERZEICHNIS XIV

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Primer – Proben für die RT-PCR	30
Tabelle 2:	Liste der verwendeten Software und Hersteller	30
Tabelle 3:	Verwendete Inhibitoren für in vitro Experimente	34
Tabelle 4:	Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie.	37
Tabelle 5:	Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten für die	
	Immunzytochemie	40
Tabelle 6:	Farbstoffe für Fluoreszenzmikroskopie	41
Tabelle 7:	Zusammensetzung eines Mini-SDS-Gels (1,5mm)	43
Tabelle 8:	Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten für den	
	Proteinnachweis auf Nitrozellulosemembranen	44
Tabelle 9:	Zusammensetzung für ein Mini-Tris-Tricin-Gel (1,5mm)	45
Tabelle 10:	Einstellung der RT-PCR.	48
Tabelle 11:	Übersicht der verwendeten Patientengruppen und ihre klinischen	
	Daten	99

Einleitung

Die sporadische Einschlusskörperchenmyositis

Bei der sporadischen Einschlusskörperchenmyositis (sporadic inclusion body myositis, sIBM) handelt es sich um eine entzündliche Muskelerkrankung, von der vor allem Patienten über 50 Jahre betroffen sind. Erstmalig wurden 1967 bei einem Patienten mit chronischer Polymyositis IBM-ähnliche Veränderungen im Muskel beschrieben, die sich durch filamentöse Einschlüsse im Zytoplasma und Nukleus auszeichneten [Chou 1967]. Vier Jahre später wurde der Begriff "Inclusion Body Myositis" (Einschlusskörperchenmyositis) [Yunis and Samaha 1971]. geprägt Krankheitsverlauf ist durch eine langsam fortschreitende Schwäche und Atrophie der distalen und proximalen Muskeln gekennzeichnet, wobei die tiefen Fingerbeuger und Beinstrecker besonders betroffen sind [Amato et al. 1996]. In Folge dessen sind die Patienten innerhalb einiger Jahre auf Gehhilfen bis hin zum Rollstuhl angewiesen [Peng et al. 2000]. Mit einer Prävalenz von ca. 5-10 Personen pro 1 Million ist die sIBM eine sehr seltene Erkrankung, deren Häufigkeit mit dem Alter auf bis zu 50 Fälle pro eine Millionen zunimmt. Insgesamt sind Männer häufiger betroffen als Frauen (im Verhältnis 3:1).



Abbildung 1: sIBM Patient mit ausgeprägter Atrophie im Quadrizeps (Oberschenkelmuskel) sowie an den Finger-Flexoren. Abb. aus *Engel et. al, Neurology* 2006

Es ist bis heute noch nicht gelungen, eine effektive Behandlungsmethode für die sIBM zu entwickeln. Die unspezifische Immunsupression mit Kortikosteroiden bleibt in der Mehrheit der Fälle erfolglos, obwohl es meist zu einer Abnahme der Kreatinkinase-Aktivität im Serum kommt [Barohn et al. 1995]. Auch die Gabe zytotoxischer Wirkstoffe

oder ein Plasmaaustausch zur Immunmodulation sind häufig ohne Erfolg [Dau 1987;Kelly, Jr. et al. 1986]. Die Therapie mit intravenösen Immunglobulinen (IVIG) führt meist nur zu einer kurzfristigen Stabilisierung der Symptome mit einer gewissen, allerdings nicht signifikanten Verbesserung der Muskelstärke [Dalakas et al. 1997;Dalakas et al. 2001;Walter et al. 2000]. Aufgrund der unzureichenden Behandlungsmöglichkeiten der sIBM sind die Bemühungen groß neue Ansatzpunkte für mögliche Therapiestrategien zu finden. Dies bildete auch die Grundlage für eines der hintergründigen Ziele der vorliegenden Arbeit.

Die Ursache der Erkrankung ist allerdings noch unklar. Im Muskel von Patienten mit sIBM scheinen autoimmun-entzündliche und degenerative Prozesse parallel abzulaufen. So finden sich Infiltrationen von mononukleären entzündlichen Zellen, vor allem von CD8⁺ T-Zellen [Muntzing *et al.* 2003]. Daher wird die sIBM wie auch die Dermatomyositis (DM) und Polymyositis (PM) zu den entzündlichen Myophatien gezählt [Dalakas 2001;Mastaglia *et al.* 2003]. Allerdings ist die sIBM pathologisch auch durch degenerative Aspekte gekennzeichnet, welche die Ausbildung der typischen "red-rimmed vacuoles", sowie Ablagerungen von Proteinen in Form der namensgebenden Einschlüsse umfasst. Vor allem β-Amyloid und andere Proteine wie phosphoryliertes Tau sind in Vakuolen, Einschlüssen oder anderen Aggregaten in den Muskelfasern zu finden. Diese kennzeichnen interessanter Weise auch die häufigste Erkrankung aus dem Formenkreis der Demenz, dem Morbus Alzheimer (AD), sind dort aber in Neuronen bzw. extrazellulär im Zentralen Nervensystem (ZNS) zu finden.

Von der Einschlusskörperchenmyositis gibt es mehrere Formen. Zum einen die bereits erwähnte sporadische (oder auch erworbene) Form, auf deren Untersuchung sich die vorliegende Arbeit beschränkt. Zum anderen existieren seltene vererbbare Varianten (hereditäre IBM, hIBM), bei denen es sich um autosomal-dominante oder autosomalrezessive Muskelerkrankungen handelt. Diese beginnen meist bereits im frühen Erwachsenenalter und treten familiär-gehäuft auf [Andrew G.Engel and Clara Franzini-Armstrong 2004].

1.1 Histopathologie der sporadischen Einschlusskörperchenmyositis

Histopathologisch finden sich im Muskel von Patienten mit sIBM typische myopathische sowie entzündliche Veränderungen. Hierzu zählen Faserkalibervariationen, zentrale Kerne und ein bindegewebiger Umbau, sowie atrophe Fasern. Weitere Charakteristika umfassen die typischen Einschlusskörperchen und

Vakuolen mit einem Durchmesser von 2 bis 25 µm, sowie nekrotische und regenerierende Fasern. Häufig findet sich in den Muskelfasern eine entzündliche Infiltration (Abb. 2) [Carpenter et al. 1978;Lotz et al. 1989].

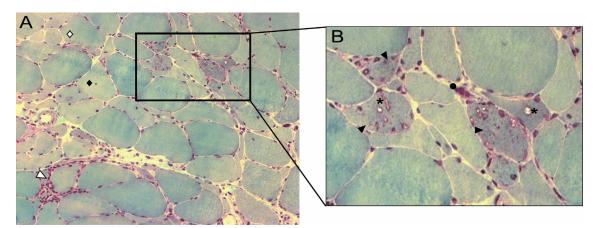


Abbildung 2: Trichromfärbung einer sIBM Muskelbiopsie: Typische histopathologische Charakteristika wie ♦: Faserkalibervariationen, ♦: internalisierte Zellkerne, Δ: entzündliche Infiltrate, ▶ Proteinakkumulationen / Einschlusskörperschen, *: *red rimmed vacuoles* und •: nekrotische Fasern. Die Aufnahmen in A wurden mit einem 20 x Objektiv angefertigt.

Die Protein-Akkumulationen bestehen überwiegend aus β-Amyloid, aber auch aus anderen Proteinen, die vor allem bei neurodegenerativen Erkrankungen vorkommen. Hierzu zählen Ubiquitin [Askanas and Engel 2006;Lowe *et al.* 1993], α-Synuklein [Bossy-Wetzel *et al.* 2004;Hashimoto *et al.* 2003;Lindersson *et al.* 2004], Hitzeschockproteine [Banwell and Engel 2000] und phosphoryliertes Tau / Neurofilament [Askanas *et al.* 1994;Mirabella *et al.* 1996a] (siehe unten).

Darüber hinaus zeigen sich bei einem Großteil der sIBM Patienten (73%) mitochondriale Veränderungen, die sich durch eine ungewöhnlich hohe Anzahl an Cytochrom C Oxidase (COX)-defiziente Muskelfasern und mitochondriale DNA (mtDNA) Deletionen verglichen zu gleichaltrigen Kontrollen auszeichnen [Oldfors *et al.* 2006]. Dieses spricht für eine zusätzliche mitochondriale Schädigung bei der sIBM [Schroder and Molnar 1997].

Im Folgenden sollen die entzündlichen und degenerativen Pathomechanismen der sIBM näher beschrieben werden. Die enge Verzahnung beider Mechanismen, sowie die bisher ungeklärte Ursache der Erkrankung sind Grundlage der vorliegenden Arbeit.

1.2 Pathomechanismen der sIBM

Die sIBM ist eine komplexe Skelettmuskelerkrankung, deren Ursache noch weitgehend ungeklärt ist. Es finden sich autoimmun-entzündliche und degenerative Bestandteile. So wandern T-Zellen in viele morphologisch unauffällige Muskelfasern ein [Muntzing et al. 2003], wohingegen die meisten vakuolisierten Fasern keine zellulären Entzündungsreaktionen aufweisen. Zudem wird der für die Antigenpräsentation wichtige Major Histocompartibility Complex I (MHC-I), der normalerweise nicht auf Muskelfasern zu finden ist, bei der sIBM überexprimiert [Karpati et al. 1988]. Zu den degenerativen Prozessen können Vakuolisierung und die intrazelluläre Akkumulation von Amyloid-assoziierten Molekülen gezählt werden. Es ist zu vermuten, dass beide Pathomechanismen miteinander interagieren, was jedoch bisher nicht belegt werden konnte. Ein mögliches Modell für das Zusammenspiel der im Folgenden näher erläuterten Pathomechanismen bei der sIBM ist in Abbildung 3 dargestellt. Darin symbolisieren die Fragezeichen bisher unzureichend verstandene Mechanismen und Interaktionen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

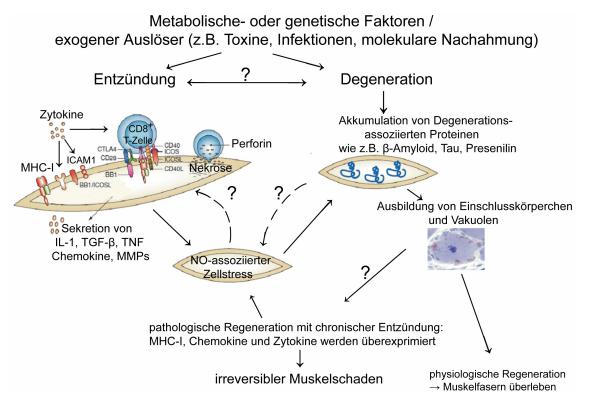


Abbildung 3: Mögliches Zusammenspiel der Patomechanismen der sIBM: Entzündung und Degeneration treten parallel in der sIBM auf, wobei bislang unklar ist, ob sich beide Pathomechanismen gegenseitig bedingen oder unabhängig von einander verlaufen. Deren Ursache und die Frage welcher Mechanismus zuerst auftritt wurde bislang noch nicht erschlossen. Die Entzündungsreaktionen zeichnen sich durch eine massive Hochregulation von Chemokinen (z.B. CXCL-9) und Zytokinen (z.B. IL-1β) aus, sowie durch die Überexpression von MHC-I und Ko-stimulatorischen Molekülen

(z.B. ICOS), wodurch die Infiltration von CD8⁺ T-Zellen begünstigt wird. Zu typischen degenerativen Charakteristika zählen Akkumulationen von abberranten Proteinen wie β-Amyliod und Tau in Form von Einschlusskörperchen, sowie die Ausbildung von *red rimmed vacuoles*. Degenerative Prozesse können entzündliche Zellstressreaktionen auslösen oder umgekehrt der entzündliche Zellstress auf die Fehlfaltung von Proteinen Einfluss nehmen. Am Ende steht meist das Zugrundegehen der Muskelfasern. Die Abbildung wurde nach Vorlage von [Dalakas 2006b] angefertigt.

1.2.1 Entzündliche Pathomechanismen bei der sIBM

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass entzündliche Mechanismen von grundlegender Bedeutung bei der sIBM sind. So konnte epidemiologisch eine Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose und Rheumatoiden Arthritis gefunden werden [Badrising et al. 2004]. Ebenfalls ließen sich bei einigen sIBM Patienten myositis-spezifische Autoantikörper nachweisen, deren pathogenetische Bedeutung weitgehend unbekannt ist [Hengstman et al. 2002]. Auch zeigten sich Assoziationen zwischen sIBM und retroviralen Infektionen, welche zur Auslösung der entzündlichen Prozesse ausreichen können [Cupler et al. 1996;Ozden et al. 2001].

1.2.1.1 <u>Induktion der Immunantwort: die Rolle von MHC-I und CD8⁺ T-Zellen</u>

Gesunde Muskelfasern exprimieren normalerweise kein MHC-I oder MHC-II. Im Gegensatz dazu wird der MHC-I Komplex bei der sIBM bereits sehr früh hochreguliert, sogar auf den Fasern, die von der Entzündung entfernt liegen [Karpati et al. 1988]. Bei anderen chronischen Muskelerkrankungen wie etwa den Dystrophien ist der MHC-I Komplex entweder gar nicht, oder nur auf degenerierenden bzw. regenerierenden Fasern zu finden. Ein weiterer charakteristischer Bestandteil der sIBM sind zytotoxische CD8⁺ T-Zellen. Diese weisen bei der sIBM, im Gegensatz zu anderen Muskelerkrankungen wie beispielsweise den Muskeldystrophien, Aktivierungsmarker auf ihrer Zelloberfläche auf, weshalb ihnen eine pathogenetische Relevanz zugesprochen wird. So exprimieren sie z.B. Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-I) und Inducible CO-stimulator (ICOS) auf ihrer Zelloberfläche [Dalakas 2004;Schroder and Molnar 1997]. ICAM-I ist in den Prozess der zellulären Adhäsion zwischen Zellen involviert und wird vor allem unter entzündlichen Bedingungen (durch Interleukin-1beta [IL-1β] und Tumor Necrosis Factor-alpha [TNF-α]) induziert. Dagegen ist ICOS als kostimulatorischer Faktor aktiv an Proliferation, Zytokinsynthese und T-Zell-Hilfe beteiligt. Man geht davon aus, dass bei der sIBM eine spezifische T-Zell vermittelte (Auto-) Immunantwort gegen das Muskelgewebe abläuft. Diese Hypothese gründet sich auf den Nachweis von klonal expandierten CD8⁺ T-Zellen im Muskel, obwohl das Antigen,

gegen das sich die Autoimmunantwort bezieht noch nicht bekannt ist [Amemiya *et al.* 2000;Bender *et al.* 1998;Muntzing *et al.* 2003]. Zudem finden sich auf den Muskelfasern sogenannte ko-stimulatorische Moleküle wie etwa die der B7 Familie (z.B. ICOS-L), deren Rezeptoren (CD28 und CTLA-4, oder ICOS) auf den CD8⁺ T-Zellen zu finden sind [Murata and Dalakas 2000;Schmidt *et al.* 2004;Wiendl *et al.* 2003]. Somit wird eine vollständige, spezifische Immunantwort ermöglicht. Als Folge dessen können die eingewanderten und aktivierten T-Zellen zytotoxische Effektormechanismen wie beispielsweise die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, *transforming growth factor-beta* (TGF-β) und TNF [Figarella-Branger *et al.* 2003;Raju *et al.* 2003;De Bleecker *et al.* 2002] oder Perforin-Granula in Gang setzten, wodurch es zur Schädigung der Muskelfasern kommt [Goebels *et al.* 1996;Schmidt *et al.* 2004]. Obwohl sowohl Fas auf den Muskelfasern, als auch Fas-Ligand (Fas-L) auf den eingewanderten T-Zellen zu finden sind, konnte bisher keine wesentliche Apoptose von Muskelfasern bei der sIBM nachgewiesen werden [Behrens *et al.* 1997;Schneider *et al.* 1996].

Neben den CD8⁺ T-Zellen sind auch andere Immunzellen im Muskel von sIBM Patienten nachzuweisen. So finden sich unter den infiltrierenden Immunzellen auch wenige B-Zellen, bei denen es sich meist um differenzierte CD138⁺ Plasmazellen handelt [Engel and Arahata 1984]. Ebenfalls zeigten sich myeloide Dentritische Zellen, die z.T. nicht-nekrotische Fasern umstellen. Allerdings ist ihre genaue Funktion bislang unklar geblieben [Greenberg *et al.* 2007]. Darüber hinaus finden sich auch Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen, allerdings in weitaus geringeren Mengen als CD8⁺ T-Zellen [Engel and Arahata 1984].

Sowohl die Expression von MHC-I / MHC-II, wie auch die von ko-stimulatorischen Molekülen, wird durch pro-inflammatorische Zytokine (vor allem Interferon-gamma (IFN-γ) und TNF-α) in Muskelzellen hochreguliert, so dass diese direkt an der Antigenpräsentation beteiligt sein können [Murata and Dalakas 2000;Schmidt *et al.* 2004;Wiendl *et al.* 2003;Michaelis *et al.* 1993].

1.2.1.2 <u>Die Rolle von Zytokinen und Chemokinen</u>

Eine weitere wesentliche Komponente der Entzündung im sIBM Muskel sind Zytokine und Chemokine. Hierbei handelt es sich um kleine, lösliche Signalproteine (ca. 25 kDa) und Glykoproteine, die ähnlich den Hormonen an der zellulären Kommunikation beteiligt sind. Zytokine sind sowohl in die angeborene als auch adaptive Immunantwort involviert und werden als Reaktion auf Pathogene von Immunzellen produziert und

ausgeschüttet, wodurch weitere Immunzellen aktiviert und rekrutiert werden. Chemokine stellen eine Unterkategorie der Zytokine dar, die über Chemotaxis die Wanderung von Lymphozyten an den Entzündungsort koordinieren.

Im Muskelgewebe von sIBM Patienten konnte die Überexpression einer großen Bandbreite an Zytokinen und Chemokinen nachgewiesen werden. Hierzu zählen insbesondere die Zytokine IL-1, IL-2, TNF-α, IFN-γ, TGF-β, IL-6 und IL-10 [Dalakas 1998;Figarella-Branger *et al.* 2003;Lundberg *et al.* 1995]. Einige der Zytokine üben auch einen direkten zytotoxischen Effekt auf die Muskelfasern *in vivo* und auf humane Myotuben *in vitro* aus [Dalakas 2006a].

An Chemokinen werden auf den Muskelfasern vor allem das *Monocyte* chemoattractant protein-1 (MCP-1), das *Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha* (MIP-1α), die durch IFN-γ induzierten Chemokine Mig (*Monokine induced by Interferongamma*; CXCL-9) und *Interferon-gamma-induciple protein-10* (IP-10, CXCL-10) sowie der Rezeptor von Mig stark überexprimiert [Figarella-Branger *et al.* 2003;Wiendl *et al.* 2003].

Durch IFN-γ wird die Produktion von Mig und IP-10 durch humane Myotuben induziert, wodurch diese selbst die Rekrutierung von aktivierten T-Zellen bewirken und somit aktiv an der endomysialen Entzündung im Muskel der sIBM Patienten beteiligt sein können [Raju *et al.* 2003].

Darüber hinaus sind Zytokine und Chemokine an der Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen wie *Vascular Adhesion Molecule* (VCAM), ICAM-1, VLA-4 (CD49d, ein β1-Integrin) und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) beteiligt. Diese Moleküle ermöglichen die Transmigration von Lymphozyten in ein Zielgewebe. Vor allem MMP-9 und MMP-2 sind auf den nicht-nekrotischen, MHC-I präsentierenden Muskelfasern der sIBM Patienten zu finden [Choi and Dalakas 2000]. Auch in anderen entzündlichen Muskelerkrankungen, wie der DM, sind Chemokine und Zytokine hochreguliert. Allerdings, ungleich der sIBM, ist hier eine Verminderung der Expression und Verbesserung der Erkrankung durch Gabe von IVIGs zu erzielen [Raju and Dalakas 2005].

1.2.2 Degenerative Pathomechanismen bei der sIBM

Die Beschreibung von amyloiden Ablagerungen in vakuolisierten Muskelfasern durch [Mendell *et al.* 1991] wies erstmal die degenerative Komponente bei der sIBM nach. Im Muskel von sIBM Patienten ist die Degeneration durch eine progrediente Vakuolisierung und Atrophie der Fasern charakterisiert, welche mit der Akkumulation

aberranten Proteinen einher geht [Askanas and Engel 2007]. Diese Proteinaggregate finden sich aber auch im Zytoplasma von nicht-vakuolisierten d.h. von morphologisch vitalen Muskelfasern [Askanas and Engel 2005;Askanas and Engel 2006]. Man unterscheidet verschiedene Formen von Aggregaten und Einschlüssen: rundliche, unregelmäßig geformte oder filamentartige Aggregate, die unter anderem phoshoryliertes Tau enthalten [Askanas and Engel 2007]. Alle Aggregatformen weisen Proteine in der β-Faltblatt-Konformation auf, was ein typisches Merkmal für Amyloid ist. Aber auch andere Proteine, die dazu neigen, falsch gefaltet zu werden und im Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen akkumulieren, finden sich in den Einschlüssen der sIBM-Fasern. Hierzu zählen unter anderem α-Synuklein [Askanas et al. 2000;Paciello et al. 2006], Presenilin 1, Apolipoprotein E (ApoE) [Mirabella et al. 1996b; Askanas et al. 1996], 26S Proteasomkomponenten und mutiertes Ubiquitin (UBB⁺¹) [Askanas and Engel 2006; Schroder and Molnar 1997]. Besonders auffällig an der Pathogenese der sIBM ist ihre Ähnlichkeit zum Morbus Alzheimer, bei dem sich teilweise identische Proteinaggregate zwischen den Neuronen im Gehirn finden. Zudem konnten hier in jüngster Zeit entzündliche Signalkaskaden gefunden werden [Town et al. 2008].

1.2.2.1 Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP), dessen Prozessierung und β-Amyloid

Das β-Amyloid Protein bildet eine zentrale Komponente der degenerativen Pathomechanismen bei der sIBM. Es wird aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (*Amyloid-Precursor-Protein*, APP) gebildet, welches als integrales Membranprotein den Typ 1 Membranglykoproteinen zugeordnet wird. Es ist sowohl in der äußeren Zellmembran, als auch in endosomalen Membranen, im Endoplasmatischen Retikulum und in Membranen des Golgi-Apparates zu finden. APP wird in vielen verschiedenen Geweben und Zelltypen exprimiert [Jung *et al.* 1996;McGeer *et al.* 1992]. Vor allem in den Synapsen der Neuronen kann man es in konzentrierter Form anfinden, allerdings ist die primäre Funktion von APP noch unbekannt. Bislang wird ihm eine Rolle in der Synapsenausbildung und Reparatur [Priller *et al.* 2006] zugeschrieben und es wird während neuronaler Differenzierung und Schädigung hochreguliert. Ebenso scheint APP in der Zellkommunikation und Zelladhäsion von Bedeutung zu sein [Zheng and Koo 2006]. APP ist das Vorläuferprotein des β-Amyloids, welches sich in der Alzheimer Erkrankung in Form von amyloiden Plaques zwischen den Neuronen anlagert.

APP besteht aus einer langen aminoterminalen extrazellulären / luminalen Domäne (Ektodomäne) und einem kleinen zytoplasmatischen Abschnitt. Die Ektodomäne kann in mehrere funktionelle Regionen untergliedert werden. Hier findet sich z.B. eine wachstumsfaktor-ähnliche (*growth factor-like domain*, GFLD) Domäne [Reinhard *et al.* 2005], ein Dimerisierungsmotiv [Wang and Ha 2004], sowie ein aktives Zentrum,

welches Zellwachstum und Differenzierung fördert [Jin *et al.* 1994;Ninomiya *et al.* 1993]. In der Nähe des C-Terminus befindet sich ein Internalisierungsmotiv, welches die effektive Internalisierung von ca. 70% des oberflächengebundenen APPs innherhalb weniger Minuten nach Erreichen der Plasmamembran ermöglicht [Vetrivel and Thinakaran 2006]. Da die Halbwertszeit von APP an der Zelloberfläche weniger als 10 Minuten beträgt [Koo *et al.* 1996], ist im Vergleich zum zellulären APP-Pool nur ein geringer Teil auf der Zelloberfläche detektierbar [Kuentzel *et al.* 1993;Sambamurti *et al.* 1992]. APP kann in drei alternativen Isoformen vorkommen: als APP 695 (neuronale Isoform) und als APP 770 oder APP 751 (periphere und gliale Isoformen), wobei aus allen β-Amyloid generiert werden kann.

Das Amyloid-Vorläuferprotein ist vielen post-translationalen Veränderungen, wie Glykosylierung, Phosphorylierung und Tyrosinsulfatierung unterworfen, wodurch die Holo-Form des APP zwischen 110 und 130 kDa liegen kann [De Strooper and Annaert 2000]. Darüber hinaus wird APP durch Proteasen der Sekretase-Familie gespalten, wodurch eine Vielzahl von Peptidfragmenten gebildet werden [De Strooper and Annaert 2000]. Wird APP durch die α-Sekretase gespalten, wird ein größeres APPSα N-terminales APP Fragment) freigesetzt Fragment (lösliches ein membranständiges 83 Aminosäuren (C83) großes α-CTF (alpha-Carboxylterminales Fragment) verbleibt. Dieses kann anschließend durch die y-Sekretase in eine freie intrazelluläre Domäne (AICD; intracellular domain fragment of APP) und in ein kleines Peptid namens p3 (3 kDa) gespalten werden [Selkoe 2004]. Dieser Weg der APP Prozessierung ist in den Neuronen im Verlauf der Gehirnentwicklung vorherrschend und ist der bevorzugte Prozessierungsweg in allen anderen Zelltypen. Da die α-Sekretasespaltung innerhalb der β-Amyloidsequenz erfolgt, wird er als nicht-toxisch oder nicht-amyloidogen bezeichnet [Esch et al. 1990]. Die zweite Möglichkeit der APP-Prozessierung ist die Spaltung durch die β-Sekretase (BACE1; beta site of APP cleaving enzyme1), wodurch zunächst APPSβ und β-CTF entsteht. Letzteres wird dann durch die sich anschließende γ-Sekretasespaltung in AICD und β-Amyloid zerlegt. Dieser pathologische, amyloidogene Weg ist der bevorzugte Metabolisierungsweg von APP in Neuronen, durch den das β-Amyloid Peptid zu einer neurodegenerativen Komponente, vor allem in der Alzheimerschen Erkrankung wird [Selkoe 2004] (vgl. Abb.2).

Das so entstandene 4 kDa große β -Amyloid, ein 39-43 Aminosäuren (AS) langes Peptid ist nicht nur Hauptbestandteil der senilen Plaques in der AD, sondern auch ein wesentlicher Bestandteil der intrazellulären Protein-Akkumulationen im Muskel der sIBM Patienten. Da die γ -Sekretase auf keine genaue Aminosäuresequenz angewiesen ist, kann β -Amyloid 40 oder 42 AS lang sein. Unter normalen

physiologischen Bedingungen beträgt das Verhältnis von β -Amyloid40 zu β -Amyloid42 90% : 10%. Die 42 AS lange Form des β -Amyloid wird als weitaus zytotoxischer als die 40 AS große Variante angesehen, da es hydrophober und anfälliger zum Selbstzusammenschluss und Oligomerisierung ist und sogenannte polymere β -Faltblattstrukturen ausbilden kann [Walsh *et al.* 2002]. In den Muskelzellen der sIBM-Patienten sind Ablagerungen aus β -Amyloid42 bestehend weitaus häufiger als diejenigen der kürzeren Form. Darüber hinaus enthalten alle kongophilen (fibrillären, amyloiden) β -Amyloideinschlüsse die β -Amyloid42 Form und nur wenige enthalten beide (β -Amyloid40 und 42). Extrazelluläre, plaquähnliche Ablagerungen von β -Amyloid, wie sie in der AD gefunden werden, gibt es in der sIBM nicht [Askanas and Engel 2006].

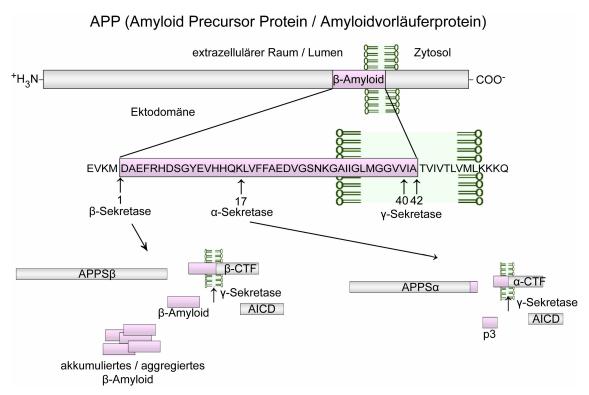


Abbildung 4: Prozessierung von APP. APP kann entweder durch die α-Sekretase oder durch die β-Sekretase prozessiert werden, wobei die Spaltung an zwei unterschiedlichen Punkten in der extrazellulären Domäne stattfindet. Durch die α-Sekretase bildet sich α-CTF, welches durch die γ-Sekretase in ein kleines Fragment namens p3 und AICD (*intracellular domain fragment of APP*) gespalten wird. Dieser nicht-toxische Weg schließt die β-Amyloidgenerierung aus. Erfolgt die APP Prozessierung über den amyloidogenen Weg mittels β-Sekretase gefolgt von der γ-Sekretase, entsteht β-Amyloid und AICD. Die Abbildung wurde modifiziert nach [Lindersson *et al.* 2004] entworfen.

Abnormalitäten bei der APP Prozessierung und deren Regulierung

Neben einer vermehrten APP-Synthese ist auch die Prozessierung von APP bei sIBM Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen verändert [Askanas and Engel 2006]. In den Muskelfasern der sIBM Patienten kommt es zu einer gesteigerten Expression der glykosylierten, transmembranen β-Sekretasen BACE1 und BACE2, die APP N-terminal von β-Amyloid spalten [Vattemi *et al.* 2001;Vattemi *et al.* 2003]. Die Bestandteile Nicastrin und Presenilin der γ-Sekretase, welche APP C-terminal spaltet um β-Amyloid40 oder 42 zu generieren, kommen ebenfalls stark überexprimiert in sIBM-Muskelfasern vor [Sisodia and George-Hyslop 2002]. Dies fördert die abnormale Anreicherung des zytotoxisch wirkenden β-Amyloids in den Muskelfasern der sIBM-Patienten.

Genau wie APP ist auch BACE1 ein integrales Typ 1 Membranglykoprotein von 72 kDa mit einem luminalen aktiven Zentrum, wodurch eine optimale topologische Orientierung für die APP-Spaltung gegeben ist [Lam et al. 2000]. Wird BACE1 in eine stabile APPüberexprimierende Zelllinie transfiziert so kommt es zu einem dramatischen Anstieg der β-Sekretaseaktivität und verstärkten Generierung von APPSβ, C99 und β-Amyliod. Dagegen führt die Behandlung dieser Zellen mit BACE1 Antisense-Oligonukleotiden zu einer deutlichen Verminderung der BACE1 mRNA-Expression, wodurch die β-Sekretaseaktivität vermindert wird. Dieser BACE1 Antisenseinhibierung folgt eine deutliche Reduktion der APPSβ, C99 und β-Amyliod Produktion 2003;Lopez et al. 2003]. Interessanterweise konnte in APP überexprimierenden BACE1 knock out Mäusen keine Form von β-Amyliod, APPSβ oder C99 im Gehirn nachgewiesen werden, wobei die Mäuse vital waren und keine phänotypischen Veränderungen zeigten [Askanas and Engel 2002; Askanas and Engel 2003]. Die Entwicklung therapeutischer BACE1 Inhibitoren soll der effektiven Verhinderung von β-Amyliod-Ablagerungen dienen und somit evtl. zur Verbesserung der kognitiven Defizite bei Patienten mit AD führen. Als weitere Möglichkeit zur effektiven Inhibierung der β-Sekretaseaktivität kann der bereits erwähnte siRNA vermittelte knock-down von BACE1 dienen. Da es sich um einen sehr vielversprechenden Ansatzpunkt zur Bekämpfung von β-Amyloid-Ablagerungen handelt, wurden beide Methoden in dieser Arbeit erstmalig im Muskel in vitro angewandt, um eine eventuelle therapeutische Relevanz bei der Behandlung der sIBM aufzuzeigen (siehe Abschnitt 4.3 im Ergebnisteil).

1.2.2.2 Andere Degenerations-und Zellstress-assoziierte Proteine

Phosphoryliertes Tau

Wie bei der AD akkumuliert phosphoryliertes Tau in den Muskelfasern von sIBM Patienten. Hier kommt es in Form von kongophilen, gepaarten helikalen Filamentaggregaten vor [Mirabella et al. 1996a]. Diese Ablagerungen sind innerhalb und außerhalb der Vakuolen in den sIBM Muskelfasern zu finden [Askanas et al. 1994].

αB-Crystallin und andere Hitzeschockproteine

Molekulare Chaperone spielen eine wichtige Rolle in der Proteinfaltung, Neufaltung und der Reparatur teilweise falsch gefalteter Proteine. Ihre Interaktion mit aggregations- und präzipitationsanfälligen Proteinen sowie deren Stabilisation ist von besonderer Bedeutung, da eine korrekte Faltung Aggregationen vorbeugt [Derham and Harding 1999]. Herrschen in der Zelle Bedingungen vor, welche die Faltung von Proteinen pathologisch verändern, werden Chaperone induziert. Eine wichtige Untergruppe der Chaperone sind die Hitzeschock-Proteine (heat shock proteins; HSP), die in die Klassen HSP33, HSP60, HSP70, HSP 90 und HSP100 (die Zahl entspricht dem Molekulargewicht) unterteilt werden. Insbesondere HSP70 ist bei der sIBM von Bedeutung. In 70 – 80% der vakuolisierten sowie in zahlreichen nicht-vakuolisierten Muskelfasern von sIBM Patienten konnten HSP70 positive Einschlüsse nachgewiesen werden, welche darüber hinaus mit β-Amyloid ko-lokalisieren [Fratta et al. 2004]. Das kleine HSP αB-Crystallin wird ebenfalls verstärkt exprimiert, wenn es stoffwechselbedingtem Stress kommt, z.B. in virusinfizierten Lymphozyten oder in senilen Alzheimer Plaques. Zudem findet sich αB-Crystallin in den abnormalen Muskelfasern von sIBM Patienten [Banwell and Engel 2000].

1.2.2.3 Oxidativer Zellstress

In Zellen kann oxidativer Stress als Folge von einem unausgewogenen Verhältnis zwischen der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und der Fähigkeit der Zelle, den durch sie angerichteten Schaden zu reparieren bzw. die gebildeten reaktiven Intermediärverbindungen zu metabolisieren, entstehen. Bei den normalerweise in gesunden Zellen vorherrschenden reduzierenden Bedingungen kommt es nicht zu vermehrten oxidativen Stress. Wird dieses empfindliche Milieu jedoch gestört, bilden sich Peroxide und freien Radikalen, die alle Zellbestandteile, inklusive Proteine, Eiweiße und Zucker direkt schädigen können. Oxidativer Zellstress ist in der Pathogenese vieler degenerativer Erkrankungen wie z.B. dem Morbus Parkinson und der AD beteiligt.

Auch in den vakuolisierten Muskelfasern von sIBM Patienten werden vermehrt Enzyme exprimiert, die an der zellulären Abwehr gegen oxidativen Stress beteiligt sind bzw. diesen fördern. Hierzu zählen z.B. die neuronale und induzierbare Stickoxidsynthetase (nNOS und iNOS), die Superoxiddismutase 1 (SOD1), Glutathionperoxidase und Catalase [Askanas and Engel 2001; Askanas and Engel 2005], sowie wie Nitrotyrosin und nuklear factor kappaB (NF-kB) [Banwell and Engel 2000;Broccolini et al. 2000]. Von besonderer Bedeutung ist iNOS, da sie nicht konstitutiv exprimiert wird, sondern durch bestimmte Stimuli (z.B. Zytokine, Lipopolysaccharide (LPS), Ischämie) in unterschiedlichen Zelltypen u.a. auch in Muskelzellen induziert werden kann [Chou 1967; Jin et al. 1994; Ninomiya et al. 1993; Zheng and Koo 2006]. Auf diese Weise ist iNOS in der Lage über einen längeren Zeitraum wesentlich höhere NO-Konzentrationen (im mikromolaren Bereich) zu produzieren, als eNOS (endotheliale Stickoxidsynthetase) und nNOS [Zheng and Koo 2006]. Am besten beschrieben wurde die Funktion von iNOS in der Abwehr von infektiösen Substanzen durch Makrophagen [Yunis and Samaha 1971]. In den aktivierten Makrophagen führt die NO-Synthese von iNOS zu einer unspezifischen Zytotoxizität gegen Bakterien, Protozoen und Tumorzellen [Amato et al. 1996]. Zahlreiche Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen, die mit NO reagieren können und so toxische Verbindungen bilden, spielen dabei eine wichtige Rolle. So können die von der NADPH-Oxidase gebildeten Superoxide rasch mit NO reagieren, wodurch Peroxinitrit und andere toxische Abfallprodukte entstehen [Yunis and Samaha 1971]. Solche reaktiven Stickstoff-Zwischenprodukte können neben DNA-Schädigungen auch Proteine durch Nitrosylierung von Cysteinen und Tyrosinresten verändern und so Stoffwechselenzyme und Membrantransporter schädigen.

In verschiedenen Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, dem Morbus Crohn oder dem Asthma bronchiale konnte eine Überproduktion von NO durch iNOS gezeigt werden [Barohn et al. 1995;Dau 1987;Kelly, Jr. et al. 1986]. Auf Grund seiner Rolle als Immunmediator und Effektormolekül spielt durch iNOS produziertes NO in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium sowohl eine protektive als auch eine deletäre Rolle [Peng et al. 2000] und trägt zur Unterhaltung von chronischen Entzündungen bei [Engel and Askanas 2006].

Die gezielte Hemmung der gesteigerten NO-Synthese zur Behandlung chronischentzündlicher Erkrankungen wird bislang nur experimentell erprobt. Hierbei werden vor allem die L-Arginin-Analoga L-NMMA (NG-Monomethyl-L-Arginin) und L-NAME (NG-Nitro-L-Arginin-Methylester) als unselektive Hemmstoffe für alle drei NOS-Formen eingesetzt. Aminoguanidin und 1400W dienen mit ihrer bis zu 100fach höheren Potenz eher als Inhibitoren von iNOS [Dalakas 2001;Mastaglia *et al.* 2003]. Im Tiermodell

entzündlicher Gelenk- und Darmerkrankungen konnte durch den Einsatz der NOS-Inhibitoren bereits ein deutlicher Rückgang der NO-Produktion und der dadurch bedingten Entzündungsreaktionen erzielt werden [Askanas and Engel 2001]. Ein ähnlicher Ansatzpunkt wurde von uns im *in vitro* Model der sIBM verfolgt (siehe Abschnitt 4.2.5 und 4.2.7 im Ergebnisteil).

1.2.2.4 Zelltodmechanismen bei der sIBM

Im Wesentlichen gibt es zwei Teilwege, durch die eine eukaryotische Zelle zugrunde gehen kann: Apoptose und Nekrose. Unter Apoptose versteht man den physiologischen Untergang einzelner Zellen oder Zellpopulationen. Daher wird sie auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Nekrose beschreibt den pathologische Untergang von Zellen und wird als traumatischer Zelltod angesehen [Kerr 1965;Kerr et al. 1972].

Die Apoptose ist gewissermaßen ein "Selbstmordprogramm" der Zelle, welches durch äußere Faktoren (extrinsischer Weg) wie z.B. Immunzellen angeregt werden kann oder durch zellinterne Prozesse ausgelöst wird (intrinsischer Weg), z.B wenn es zu übermäßigen DNA-Schädigungen gekommen ist. Apoptose gilt als Teil des normalen Zellstoffwechsels, da sie von der Zelle aktiv durchgeführt wird und somit sichergestellt werden kann, dass es zu keiner weiteren Gewebeschädigung kommt. An diesem Weg des Zelltodes sind vor allem Caspasen, Enzyme mit proteolytischer Aktivität, beteiligt. Durch die apoptotischen Prozesse kommt es zum Schrumpfen der Zellkörper und die DNA wird durch Endonukleasen in definierte Fragmente gespalten. Bei der Nekrose kommt es dagegen zum Anschwellen des Zellkörpers, wodurch die Plasmamembran zerstört wird und das Zytoplasma und die Organellen in den extrazellulären Raum gelangen. Dies hat lokale Entzündungsreaktionen zur Folge, wodurch Makrophagen angelockt werden, die wiederum entzündliche Botenstoffe (zB. TNF-α) ausschütten. Ausgelöst wird dieser Zelltodweg durch schädigende Einflüsse wie Gifte, Bakterien, Nährstoff- und Sauerstoffmangel, Verletzungen, Infektionen oder Entzündungen. Hierbei kommt es ebenfalls zur Freisetzung von zuvor in Lysosomen gelagerten Enzymen (sogenannter Lysozyme), die einzelne Komponente der Zelle oder sogar die ganze Zelle selbst "verdauen". Im Gegensatz zur Apoptose kommt es bei der Nekrose zur Freisetzung von toxischen Stoffen, die umliegende Zellen schädigen [Brune 2003; Chen and Goeddel 2002; Chiarugi and Moskowitz 2002; Fesik and Shi 2001; Popov et al. 2002; Wajant 2002].

Bei der sIBM und anderen entzündlichen Myopathein ist hauptsächlich Nekrose für das Zugrundegehen der Muskelfasern verantwortlich [Olive et al. 1997;Behrens et al. 1997;Schneider et al. 1996;Tews and Goebel 1998;Nagaraju et al. 2000]. Klassische

apoptotischen Eigenschaften konnten dagegen in der Myositis bisher nicht nachgewiesen werden [Schneider et al. 1996;Olive et al. 1997;Inukai et al. 1997;Wang et al. 1997]. Im in vitro Modell der sIBM der vorliegenden Arbeit wurde der Zelltodmechanismus unter pro-inflammatorischen Bedingungen genauer analysiert (vgl. Abschnitt 4.2.7.1 im Ergebnisteil).

1.3 Ziel der Arbeit

Die komplexe Pathogenese der sIBM wirft viele Fragen auf. So ist nicht nur die Ursache der Erkrankung bislang noch ungeklärt geblieben, sondern auch ob ein Zusammenhang zwischen Entzündung und Degeneration besteht, ob sich diese beiden Pathomechanismen gegenseitig bedingen und welcher zuerst auftritt.

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war es einen möglichen Zusammenhang zwischen Entzündung und Degeneration bei der sIBM zu untersuchen, um daraus gegebenenfalls neue Therapiestrategien ableiten zu können. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der Interaktion zwischen entzündlichem Zellstress und der Akkumulation von β-Amyloid. Für derartige Untersuchungen ist die Anschaffung von *in vivo* Material, aufgrund der Seltenheit der sIBM Erkrankung erschwert und ein gängiges *in vitro* Modell nicht etabliert.

Die Entwicklung eines *in vitro* Modells, welches sowohl die entzündliche, als auch die degenerative Pathologie der sIBM in nicht-pathologischen Myotubenkulturen nachstellt, bildet die Grundlage dieser Arbeit. Anhand dieses Modells sollte im Folgenden die mRNA- und Proteinexpression von Entzündungs- und Degenerations-assoziierten Markern analysiert werden, sowie unterschiedliche Zellstress- als auch Zelltodmechanismen und ihre möglichen Ursachen.

Im Einzelnen sollten vier übergeordnete Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Ist iNOS entscheidend an der Pathogenese der sIBM beteiligt?

Dazu wurde sowohl die iNOS-Expression als auch dessen NO-Produktion *in vitro* basal und unter pro-inflammatorischen Bedingungen gemessen, sowie deren Einfluss auf Zellstress und Zelltod genauer beleuchtet. Zudem kamen verschiedene iNOS-Inhibitoren zum Einsatz um neue Therapieansätze zu erschließen.

- 2. Welche Rolle spielt die β -Sekretase BACE1 in der Pathogenese der sIBM? Hierfür sollte erstmalig die *in vitro* Expression von BACE1 unter pro-inflammatorischen Bedingungen untersucht werden und mittels siRNA vermitteltem *knock-down* von BACE1 dessen Bedeutung für die Akkumulation von β -Amyloid. Auf diesem Weg werden sich neue Erkenntnisse über den Einfluss von β -Amyloid-assoziiertem Zellstress auf weitere degnerative sowie entzündliche Prozesse im Muskel erhofft.
- 3. Welche Rolle spielt die APP Überexpression in der sIBM Pathogenese? Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob es möglich ist, durch adenovirale Überexpression von APP im nicht-pathologischen Muskel ein weiteres in vitro Modell der sIBM zu etablieren, welches insbesondere die degenerative Komponente der Erkrankung abbildet. Gleichzeitig sollte geklärt werden welche Auswirkungen dies auf entzündliche Prozesse im Muskel in vitro hat.

4. Sind primäre Myotubenkulturen von sIBM-Patienten suszeptibler gegenüber proinflammatorischen Zytokinen?

Hiefür sollte die Expression von sIBM-relevanten entzündlichen und degenerativen Markern in primären Myotubenkulturen von sIBM Patienten im Vergleich zur Expression in nicht-myopathischen Myotubenkulturben, Myotubenkulturen anderer Myopathien oder ALS / Neuropathien *in vitro* sowohl basal als auch im entzündlichen Milieu analysiert werden.

MATERIAL 18

Material

2.1 Geräte

BANDELIN, Berlin, Deutschland

Ultraschall-Sonifikator Typ HD2070-Sonoplus

BD Bioscience, Pharmingen, Heidelberg, DeutschlandDurchflusszytometer Typ BD FACS Calibur

BIORAD, München, Deutschland

Elektrophoresis-Constant- Typ PowerPacHC[™]

Power-Supply

Immunoblot- und Transferkammer Typ Mini-PROTEAN®3 cell

(und Zubehör)

BIOSAN, Riega, Lettland

Heizblock Dry Block Heating Thermostat Typ BioTDB-100

BRAND, Wertheim, Deutschland

Pipetboy Typ Accu-Jet[®]

EPPENDORF-NETHELER GmbH, Hamburg, Deutschland

Automatische Pipettierhilfen Typ Research

(2,5; 10; 20; 100; 200; 1000 µl Hubvolumen)

Multikanalpipette Typ Research

PCR-Gerät Typ Mastercycler Gradient

Photometer Typ Biophotometer

Tischzentrifuge Typ 5415R, MiniSpinPlus

INCUTEC, Mössingen, Deutschland

Brutschrank Incubator IS-2

HEIDOLPH, Schwabach, Deutschland

Heizbarer Magnetrührer Typ MR3001 Inkubationswippe Polymax 1040

HERAEUS, Hanau, Deutschland

Kühlschrank (-80°C) Typ HFU 586Top

CO₂-Brutschrank Typ Heracell150 und Heracell240

Sterilbank Typ HS18, Klasse II Zentrifuge TypMultifuge 1 S-R

LAUDA, Lauda-Königshofen, Deutschland

Wasserbad A100

LIEBHERR, Ochsenhausen, Deutschland

Kühlschrank (4°C) Typ Liebherr Premium

Kühlschrank (-20°C) Typ Liebherr Premium no-frost

LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland

UV-Tisch für Agarose-Gele Typ TCP-20-M

MATERIAL 19

PEQLAB, Erlangen, Deutschland

Nanodrop Typ ND-1000 Spectralphotometer

PHILIPS, Eindhoven, Niederlande

Mikrowellengerät Typ 5001 AKB279/PH

SARTORIUS, Göttingen, Deutschland

H₂O-Bidestgerät Arium[®]611

Feinwaage Typ CP 124S und Typ BL3100

SCHÜTT, Göttingen, Deutschland

Flachbett-Elektrophoresekammer Typ Agagel Maxi und Mini

(einschließlich Zubehör)

Gasbrenner Typ Flammy S

Mixer Typ Vor-Tex-Genie 2[™], Scientific Industries,

Vertrieb: SCHÜTT

ZEISS, Oberkochen, Deutschland

Mikroskop Typ Axiovert 40
Mikroskop für Immunfluoreszenz Typ Axiovert 200

TECAN, Crailsheim, Deutschland

Mikrotiter Plattenphotometer Mycroplate systems, Sunrise

WTA Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland

pH-Meter Typ inoLab Level3

2.2 Chemikalien

ADEFO CHEMIE GmbH, Dietzenbach, Deutschland

Adefo Entwickler Konzentrat T-Matic, Adefo Fixierer Konzentrat T-Matic,

ALPHA INNOTECH, SanLeandro, USA

ChemiGlow[™]West

AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig, Deutschland

Dimethyl Sulfoxid (DMSO)

CALBIOCHEM-NOVABIOCHEM, Bad Soden, Deutschland

Mounting Medium (Mowiol®)

CHEMICON, Millipore, Schwalbach, Deutschland

Blot Restore Solution A und B

ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES, Hatfield, UK

Paraformaldehyd (PFA) 32%ige Lösung

FLUKA, SIGMA-ALDRICH, CHEMIE GmbH, Taufkirchen, Deutschland

NonidetP40 Substitute (NP40)

GIBCO, Karlsruhe, Deutschland

N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic-acid) (HEPES); Natriumpyruvat; 0,05 % Trypsin / EDTA; UltraPure Destilliertes Wasser DNase, RNase frei

MATERIAL 20

INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland

qRT-Puffer: Platinum®qPCR SuperMix-UDG; SuperScript™II Reverse Transkriptase

MERCK, Darmstadt, Deutschland

2-Mercaptoethanol; Ethidiumbromid; Trypanblau für Mikroskopie

PAA, Pasching, Österreich

Lymphozyten Separationsmedium; FCS (Fötales Kälberserum); BSA (Rinderserum); Nanofectin siRNA; Nanofectin I

ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim, Deutschland

Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets

ROTH, Karlsruhe, Deutschland

Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$; Ammoniumchlorid NH₄CI; Ammoniumpersulfat Bromphenolblau $C_{19}H_9Br_4O_5SNa$; $(NH_4)_2S_2O_8;$ Calciumchlorid CaCl₂; EDTA C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈*2H₂O; Glycerin wasserfrei C₃H₈O₃; Glycin C₂H₅NO₂; Harnstoff (Urea) CH₄N₂O; Kalimuchlorid KCl; Kalimhydrogenphosphat KH₂PO₄; LB Agar; Natriumacetat Nartiumchlorid NaCl: Natriumhydrogenphosphat CH₃COONa: Natriumhydrogenphosphat Monohydrat NaH₂PO₄*H₂O; Natriumhydrogenoxid NaOH; SDS Ultra Pure $C_{12}H_{25}NaO_4S$; Tris Ultra $C_4H_{11}NO_3$; Tween20; Essigsäure; Bromphenolblau; Methanol; Ethanol; Roti®Phenol; Rotiphorese®Gel B 2 % Bisacrylamid; Rotiphorese[®]Gel 30 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid; TEMED, Ethidiumbromid

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Ponceau S Solution; Agarose; ThioflavinS

SOUTHERN BIOTECH, Alabama, USA

Fluoromount-G

TSI-GmbH, Zeven, Deutschland

Succofin Magermilchpulver

2.3 Labormaterialien

AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig, Deutschland

Hyperfilm[™]ECL[™]

ANAMED Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau, Deutschland

4-12% VarioGel^R

BD BIOSCIENCE, Bedford, USA

FACS-Röhrchen 5ml Polystyrene Round Bottom Tubes

BRAUN-MELSUNGEN, Melsungen, Deutschland

Einwegspritzen 2, 5, 10, 20 ml; Kanülen "Sterican 0,4 x 20 mm / 27G"; "Sterican 0,6 x 30 mm / 23G"; "Sterican 0,8 x 40 mm / 21G"

COSTAR CORNING, Badhoevendorp, Niederlande

Zellschaber (steril)

EPPENDORF, Hamburg, Deutschland

Küvetten, Typ UVette 50-1600 µl

GREINER GmbH, Nürtingen, Deutschland

6 Well-Platten

IN VITRO SYSTEMS & SERVICE, Göttingen, Deutschland

75 ml Zellkulturflaschen; 24 well Platten

KRANNICH GmbH, Göttingen, Deutschland

Zählkammer, Typ Neubauer Improved

LO Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland

Zählkammer Neubauer-Improved

MILLIPORE, Schwalbach, Deutschland

0,22 µm GP Express Plus Membran Sterilfilter

MILTENYI Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland

LS Colums; Pre-Separationsfilter

MENZEL-GLÄSER®, Braunschweig, Deutschland

Deckgläser 24x60mm #1

NUNC GmbH, Wiesbaden, Deutschland

TC-Microwell 96F; LabTek[®]II 8-Kammer Chamberslides, Cryotube™vials, Cryo-Einfriergreät

SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland

Gewebekulturschalen (Ø 10 cm, Ø 5 cm, Ø 2,5 cm); Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml; 15 und 50 ml Plastikröhrchen (steril); Gilsonpipettenspitzen (gelb und blau); Kristallpipettenspitzen, PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml

SCHLEICHER&SCHUELL, Erdmannshausen, Deutschland

0.2 µm Whatman Protan Nitrocellulodemembran

WU-Mainz, Deutschland

Pasteurpipetten

2.4 Lösungen und Puffer

Annexin-Puffer

10 mM HEPES pH 7,4 150 mM NaCl 5 mM KCl 2 mM CaCl₂ ad 100 ml dH₂O

10 x Anoden-Puffer

2 M Tris

ad 500 ml dH₂O pH 8,9

1 x Anoden-Puffer (für Tris Tricin Gele)

100 ml 10 x Anoden-Puffer

ad 1000 ml dH₂O

Acryl-Bisacrylamid-Lösung

30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid gebrauchsfertig von Roth verwendet

APS

10% Ammoniumpersulfat in dH₂O

Blockierungslösung (für Westernblot)

1% BSA in TBS-Tween-Puffer (1g *ad* 100 ml) oder

5% Magermilchpulver (5g ad 100 ml) in TBS-Tween-Puffer

EDTA-Stammlösung

0,5 M EDTA-Na₂

pH 8,0

5 x Elektrophorese-Puffer / Westernblot-Puffer

 $\begin{array}{ccc} 15 \ \mathrm{g} & \mathrm{Tris} \\ 100 \ \mathrm{g} & \mathrm{Glycin} \\ 5 \ \mathrm{g} & \mathrm{SDS} \\ \mathit{ad} \ 1000 \ \mathrm{ml} & \mathrm{dH}_2\mathrm{O} \end{array}$

1 x Elektrophorese-Puffer / Westernblot-Puffer

200 ml 5 x Elektrophorese-Puffer

ad 1000 ml dH₂O

FACS-Puffer

1,5% FCS

0.1% Natriumazid

in PBS

Hypotonpuffer (membranständige Proteine)

10 mM Tris 1 mM EDTA 1 mM EGTA

in dH₂O pH 7,6

10 x Kathoden-Puffer

1 M Tris 1 M Tricin 1% SDS

ad 1000 ml dH₂O pH 8,9

1 x Kathoden-Puffer (für Tris Tricin Gele)

100 ml 10 x Kathoden-Puffer

ad 1000 ml dH₂O

Lyse-Puffer (zytosolische Proteine)

 $\begin{array}{ccc} 952 \text{ mg} & \text{HEPES} \\ 1 \text{ M} & \text{NaCl} \\ 0,05 \text{ M} & \text{EDTA} \\ 1\% & \text{NP40} \\ \textit{ad} \ 300 \text{ ml} & \text{dH}_2\text{O} \end{array}$

pH7,9

MACS-Puffer

10 x PBS 100 ml 6,7 ml 0,3 M EDTA

5 g BSA ad 1000 ml dH_2O

Mounting Medium + Anti-Fading-Reagenz

2,4 g Mounting Medium (Mowiol®) 6,0 g Glycerol (=4,76 ml Glycerol)

6 ml dH₂O

12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5

+ p-Phenylendiamin: Endkonzentration 1 mg/ml

Probenauftragspuffer für SDS-PAGE Gelelektrophorese (PAGE-Puffer 10 x)

0,127 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1% Bromphenolblau

4% SDS 20% Glycerol

10% Mercaptoethanol

4% PFA-Puffer

Mit 1 x PBS aus 32% Paraformaldehyd-Stammlösung hergestellt.

PBS-Puffer (10 x)

400 g NaCl 10 g KCI 71 g Na₂HPO₄ NaH₂PO₄xH₂O 69 g

ad 5000 ml dH_2O

pH 6,7

1 x PBS-Puffer

100 ml 10 x PBS-Puffer

ad 1000 ml dH₂O

50 x TAE-Puffer

242 g Tris-Base 57 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

ad 1000 ml dH₂O

10 x TBS-Puffer (Stammlösung)

Tris 24 g NaCl 80 g *ad* 1000 ml dH_2O

pH 7,6

TBS-Puffer (1 x)

100 ml 10 x TBS ad 1000 ml dH₂O

TBS-Tween

1x TBS-Puffer 1000 ml 0,1% Tween 20

Transfer-Puffer

25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol ad 2000 ml dH₂O

Urea-Puffer (membranständige Proteine)

8 M Urea 0,1 M Na_2HPO_4 0,1 M NaH_2PO_4 0,01 M Tris-HCl pH 8

Zitrat-Puffer (Waschpuffer für Immunpräzipitation)

4,7 g Zitratsäure

9,.2 g Di-Natriumhydrogenphosphat

ad 1000 ml dH₂O pH 5,0

Zitrat-Puffer-Tween

1000 ml Zitrat-Puffer 0,01% Tween 20

2.5 Medien

LB-Medium (Luria-Bertani)

10 g Trypton (1%)

5 g Hefeextrakt (0,5%)

10 g NaCl (1%)

ad 1 Liter mit dH₂O, auf pH 7 einstellen, anschließend autoklavieren.

S.O.C.- Medium:

Gebrauchsfertig von der Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland bezogen.

S.O.C.- Medium besteht aus SOB (Super Optimal Broth) - Medium, dem 20 mM Glucose zugesetzt wurde. Es wird insbesondere bei der Transformation von Bakterien eingesetzt. SOB ist ein komplexes Nährmedium, das vor allem zur Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien verwendet wird. Die Zusammensetzung wurde 1983 von [Hanahan 1983] formuliert.

2.5.1 Medien für die Zellkultur

Alle verwendeten Medien wurden vor dem Gebrauch steril filtriert und bei 4°C gelagert.

DMEM-Medium (mit L-Glutamine [400 mM] **und Glucose** [4,5 g / l]):

für die RD-Zellline CCL136 (Myoblasten)

Dulbecco's modified Eagle's medium (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) versetzt mit hitzeinaktiviertem 10% FCS (fötales Kälberserum) und 1% Penicillin/Streptomycin.

DMEM-Medium (mit L-Glutamine [400 mM] **und Glucose** [4.5 g / l]) + Pferdeserum

für die Primärmuskelzellkultur

Dulbecco's modified Eagle's medium (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) versetzt mit hitzeinaktiviertem 2% Pferdeserum und1% Penicillin/Streptomycin.

Skeletal Muscle Cell Growth Medium

für die Primärmuskelzellkultur

Gebrauchsfertig von der Firma Provitro, Berlin, Deutschland bezogen.

X-VIVO 15

für die Versuchsdurchführung

Gebrauchsfertig von der Firma Lonza, Verviers, Belgien bezogen.

2.6 Zelllinien, Bakterienstämme, Plasmide und siRNA

2.6.1 Zelllinien

Rhabdomyosarkoma Zellen (RD Zellen)

Die Rhabdomyosarkomazellen mit der ATCC-Nr. CCL136 (vom Institut für angewandte Zellkultur, München, Deutschland) wurden für alle Vorexperimente verwendet und nachfolgend als Myoblasten bezeichnet.

Primärmuskelzellen

Die nicht-pathologischen Kontrollen wurden im Rahmen von Routineoperationen an Knie oder Hüfte aus dem Skelettmuskel gewonnen. Die Proben der sIBM-Patienten, von Patienten mit anderen Myopathien oder mit ALS / Neuropathien stammten aus diagnostischen Biopsaten. Alle Patienten wurden zuvor über die Verwendung Ihres Gewebes zu Forschungszwecken aufgeklärt und ihre Einverständniserklärung im Rahmen des vorliegenden Ethikantrages (Nr. 30/9/05) eingeholt. Aus den Biopsaten wurden die jeweiligen Satellitenzellen (Vorläuferzellen) entsprechend Methode 3.1.6.1 gewonnen und Primärzellkulturen angelegt. Eine Auflistung der Patienten- sowie ihre klinischen Daten ist der Tabelle 11 des Ergebnisteils Kapitel 4.5.

2.6.2 Bakterienstämme

Zur Klonierung wurden der *Escherichia coli* Stamm One Shot[™]TOP 10F' (F' {laclq Tn10(TetR)} mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1

araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG) der Firma Invitrogen verwendet.

2.6.3 Plasmide

Der Nachweis von BACE1 mittels Immmunzytochemie und Immunoblot wurde anhand CCL136 Zellen etabliert, die BACE1 transient überexprimierten. Die Transfektion der Zellen erfolgte mittels der Plasmide **pBlueBace1** (5169 bp) und **pSBaERGFP Pro** (7199bp), welche uns freundlicherweise von Steffen Roßner (Leipzig) zur Verfügung gestellt wurden.

2.6.4 siRNA

Die siRNA Transfektion zum spezifischen knock-down von Genen erfolgte mit der BACE1-Silencer® Validated siRNA und Silencer® Negative Control siRNA von Applied Biosystems.

2.7 Antikörper, Farbstoffe, Inhibitoren, Zytokine und Seren

ABCAM, Cambridge, UK

Kaninchen Anti-humman BACE1, polyklonal Kaninchen Anti-humman Desmin, polyklonal

BENDER MedSystems, Cambridge, UK

Anti-humman AnnexcinV APC-gekoppelt

CALBIOCHEM, Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaninchen Anti-humman BACE1, C-terminal, polyklonal

4,5-Diaminofluorescein Diacetat (DAF-2 DA) L-N^G-monomethyl Arginine (L-NMMA) N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidine 1400W β-Secretase Inhibitor IV

COVANCE, Vertrieb: HISS Diagnostics GmbH, Freiburg, Deutschland

Maus Anti-humman β-Amyloid, 1-16 (Klon 6E10, monoklonal)

CHEMICON, Millipore, Schwalbach, Deutschland

Kaninchen Anti-iNOS

Rekombinantes humanes Interleukin (IL)-1β Rekombinantes humanes Interferon (IFN)-γ Rekombinanter humaner Tumornekrosefaktor (TNF)-α

Maus Anti-human β-Amyloid, 17-24 (Klon 4G8, monoklonal)

GENETICS COMPANY, Inc., Schlieren, Zurich, Switzerland

Maus Anti-human β-Amyloid N-terminal (Klon WO-2)

JACKSON IMMUNO RESEARCH, Suffolk, UK

HRP-konjugiertes Affini Pure Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L) HRP-konjugiertes Affini Pure Ziege Anti-Mause IgG (H+L)

Eselserum

MILTENYI Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland

CD56⁺ MicroBeads

MOLECULARE PROBES, Invitrogen detection technologies, Eugene, Oregon, USA

DAPI (4', 6-diaminidino-2-phenylindole, dihydrochloride)

Alexa Fluor®488: Ziege Anti- Kaninchen IgG (H+L)

Ziege Anti- Maus IgG (H+L) Ziege Anti- Ratte IgG (H+L)

Alexa Fluor®594: Ziege Anti- Kaninchen IgG (H+L)

Ziege Anti- Maus IgG (H+L)
Ziege Anti- Ratte IgG (H+L)
Esel Anti- Ziege IgG (H+L)

Alexa Fluor[®]647: Ziege Anti- Maus IgG (H+L)

Dynabeads Protein G

Propidiumiodid
7- Aminoactinomycin

7- Aminoactinomycin (7-AAD)

Pferdeserum

R&D SYSTEMS GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Ziege Anti-CXCL-9 (Mig) genereller Caspaseinhibitor Q-VD-OPh

SANTA CRUZE BIOTECHNOLOGY, Heidelberg, Deutschland

Kaninchen Anti-GFP(FL), polyclonal

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Maus Anti-β-Actin, monoklonal

5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFH-DA) Staurosporin von *Streptomyces sp.*

SEROTEC, Düsseldorf, Deutschland

Kaninchen Anti-alphaB-Cyrstallin, polyklonal Kaninchen Anti-Amyloid Precursor Protein (APP), polyklonal Ratte Anti-HLA ClassI (monomorphic A,B,C)

Ziegenserum

UPSTATE, Millipore, Schwalbach, Deutschland

Kaninchen Anti-Nitrotyrosin

2.8 Längenstandards

2.8.1 Längenstandards für das Immunoblotting

Als Längenstandard bei der Auftrennung von Proteingemischen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente der Precision Plus Protein[™] Standard (BIO-RAD). Der Kaleidoscope Polypeptide Standard (BIO-RAD) wurde als Längenstandard bei der Auftrennung von kleinen Proteinen im Tris-Tricin-Gel verwendet.

2.8.2 Längenstandards bei der Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Bei der Agarose-Gelelektrophorese von DNA wurden die Längenstandards O'GeneRuler 100 bp und 1 kb von Fermentas verwendet.

2.9 Restriktionsenzyme und Antibiotika

2.9.1 Restriktionsenzyme

Der enzymatische "Restriktionsverdau" zur Detektion der erwünschten Plasmide erfolgte mit den Restriktionsenzymen **EcoRI** und **DrallI** bzw. mit **EcoRI** und **HindIII**, der Firma Fermentas in den entsprechenden Puffern.

2.9.2 Antibiotika

2.9.2.1 Ampicillin

Ampicillin wirkt gegen die meisten Gram-negativen Bakterien, indem es die Bildung der bakteriellen Mureinschichten unterbindet.

Zur Lagerung wurden 50 mg Ampicillin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in sterilem dH₂O gelöst und anschließend durch einen 0,22 μm-Filter sterilfiltriert und bei -20°C eingefroren. Die Arbeitskonzentration zur *E.coli*-Selektion betrug 100 mg / l.

2.9.2.2 Penicillin

Penicillin hat eine Bakterien-abtötende Wirkung, da es in die Zellteilung der Bakterien eingreift und ihr Wachstum und ihre Vermehrung unterbinden.

2.9.2.3 Streptomycin

Streptomycin hat ein breites Wirkungsspektrum, wobei vor allem gram-negative Erreger geschädigt werden. Da es die 30S-Untereinheit der prokaryontischen 70S-Ribosomen hemmt, kann die Aminoacyl-tRNA nicht mehr an die Akzeptorstelle binden

und dementsprechend wird die gesamte Translation und in Folge eine Bakterienvermehrung unterbunden.

Penicillin und Streptomycin wurden als fertiges Gemisch von der Firma Biochrom AG (Berlin, Deutschland) mit einer Lagerungskonzentration von 10000 U / 10000 μg / ml bezogen und als 1 % Lösung in den Zellkulturmedien eingesetzt.

2.10 Kits

2.10.1 RNAesy Kit

Zur Extraktion von mRNA aus der Zellkultur wurde der RNAesy Kit der Fima Quiagen[®] entsprechend den Herstallerangaben verwendet. Abweichungen sind unter Protokoll 3.3.1 aufgeführt.

2.10.2 Jetstar Kit

Zur Plasmidaufreinigung aus Mini und Maxi-Kulturen wurde der Jetstar Kit der Firma Genomed[®] entsprechend den Herstallerangaben verwendet. Abweichungen sind unter Protokol 3.3.8.1 aufgeführt.

2.11 Primer-Proben für die Real-Time-PCR:

2.11.1 selbst entwickelte Oligodesoxyribonukleotide als Primer zur Real-Time PCR von MHC-I

HLA I_for:

5'-TGG AGT GGC TCC GCA GAT AC-3'

HLA I rev:

5'-AGT GTG ATC TCC GCA GGG TAG A-3'

2.11.2 Primer - Proben für die Real-Time PCR

Alle weitern Primer - Proben wurden über Applied Biosystems bezogen und sind in nachfolgender Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Primer - Proben für die Real-Time-PCR

Assay ID	Gensymbol	alternativer Name	Genname
Hs99999905 m1	GAPDH		glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Hs00169098 m1	APP		amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)
Hs00171065_m1	CXCL9	Mig	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
Hs00157107_m1	CRYAB		crystallin, alpha B
Hs00167257_m1	NOS2A	iNOS	nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)
6FAM-			
TGGAGAACGGGAAGGA	hHLA I	MHCI	major histocompatibility complex 1
Hs00201573_m1	BACE1		beta-site APP-cleaving enzyme 1
Hs00174097_m1	IL1B		interleukin 1, beta

2.12 Software

Zum Anfertigen der Dissertation wurden die unter Tabelle 2 aufgelisteten Softwareprogramme verwendet.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Software und Hersteller

Software	Firma
Software für die RT-PCR und deren Auswertung, Sequence-Detektion Software Version 1.3.1., 7500 System SDS-Software	Applied Biosystems, Foster City, USA
Software zur Messung von RNA- Konzentration Nano Drop ND-100 V.3.1.2.	Coleman Technologies Inc., Orlando, USA
Software für Durchflusszytometrie, Cell Quest ™ pro Version 5.1.1	BD Biosciences, Heidelberg
Software zur Auswertung der Durchflusszytometrie, <i>Windows Multiple</i> <i>Document Interface for Flow cytometrie</i> (WinMDI)	The Scripps Research Institute, West Palm Beach, USA
Software zur Aufnahme von Bildern am Fluoreszenzmikroskop, Image-Pro®MDA Version 5.1.2.59	Media Cybernetics, Inc., Bethesda, USA
Software zur Bildbearbeitung, Adobe Photoshop CS	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
Software zum Erstellen von Abbildungen, Adobe Illustrator CS	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
Software für die Grauskalenanalyse, Scion Image für Windows	Scion Corporation, Maryland, USA
Microsoft®Office 2003	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Software zur Erstellung von Graphiken, GraphPad Prism 4.03 für Windows	Graph Pad Software Inc, La Jolla, USA
Reference Manager Professionale Edition Version 10	Researchsoft, London, England
Software zum Einscannen von Bildern und Westernblots, Epson Smart Panel	Seiko Epson Corporation,
Software zum Invertieren von Bildern, Irfan view	Irfan Skiljan, Wien, Österreich

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Allgemeine Hinweise zum Arbeiten mit Zellkulturen

Zum Vorbeugen von bakteriellen und / oder fungiformen Verunreinigungen erfolgte das Arbeiten mit Zellkulturen unter sterilen Bedingungen. Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Sterilbank der Sicherheitsklasse 2 durchgeführt, und alle verwendeten Materialien und Geräte wurden vor Gebrauch autoklaviert oder hitzesterilisiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5% in feuchter Atmosphäre. Alle verwendeten Zelllinien besitzen eine reguläre Verdopplungszeit von etwa 24 h, die verwendeten humanen primären Myotubenkulturen wachsen dagegen nicht kontinuierlich.

3.1.2 Kultivierung von adhärenten Zellen

Die adhärent wachsende Rhabdomyosarkomazelllinie (RD Zellen) CCL136 wurde in DMEM-Medium (4,5% Glucose) mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin kultiviert. Primärmuskelkulturen wurden in DMEM-Medium (4,5% Glucose) mit 10% FCS, 0,5% Hühnchenembryoextrakt, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin bzw. in Primärmuskelkulturmedium (Skeletal muscle growth medium) der Firma Provitro kultiviert. Das Ablösen der Zellen erfolgte nach einmaligem Waschen mit warmem 1 x PBS und 1 Min Inkubation bei 37°C in warmem Trypsin (0,05% Trypsin-EDTA) in frischem Medium.

Für die Experimente wurden alle Zellen in serumfreiem Medium (X-Vivo) kultiviert.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde der Trypan-Blau-Test angewandt. Dem zum Zählen entnommenen Volumen Zellsuspension (10 µl) wurde 1 Volumen Trypan-Blau-Lösung zugegeben. Dieser Farbstoff kann in alle Zellen eindringen und wird von den Lebenden aktiv wieder ausgeschleust, so dass nur tote oder geschädigte Zellen angefärbt werden. Da Trypan-Blau zytotoxisch ist, musste die Auswertung sofort erfolgen. Die Lebend-Zellzahl wurde durch Auszählen der nicht angefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmt.

3.1.4 Gefrierkonservierung von eukaryotischen Zellen

Zur Konservierung eukaryotischer Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Einfrieren wurden die Zellen mit 0,05% Trypsin-EDTA wie zuvor beschrieben abgelöst und in Medium aufgenommen, abzentrifugiert (300 x g, 5 min, 4°C) und mit Einfriermedium (hitzeinaktiviertes FCS + 10% DMSO) auf eine Zellzahl von 2-10 x 10⁶ Zellen / ml eingestellt. Zum Einfrieren wurde je 1 ml der Zellösung in ein vorgekühltes Kryokonservierungsröhrchen überführt und 24 h bei -80°C in einem Cryo-Einfriergerät (Nunc) eingefroren. Die weitere Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff [Jakoby and Pastand 1979].

3.1.5 Auftauen von Zellen

Die in Kryoröhrchen gefrierkonservierten Zellen wurden für kurze Zeit im 37°C Wasserbad erwärmt, bis die Zellsuspension fast vollständig aufgetaut war. Anschließend wurde diese in 10 ml erwärmtes Kulturmedium überführt, um das zelltoxische DMSO auszudünnen. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 5 Min, RT), das Pellet in warmem Medium resuspendiert und in einer Gewebekulturflasche (75 ml) mit 12 ml Medium im Brutschrank kultiviert [Jakoby and Pastand 1979].

3.1.6 Generierung von Primärmuskelzellkulturen

3.1.6.1 Initiale Preparation des Muskels

Das frische Muskelbiopsat (Herkunft vgl. Materialien 2.6.1 und Ergebnisteil 4.5) wurde in eine Petrischale überführt und mit einem sterilem Skalpell oder Schere zerkleinert. Anschließend wurde das Biopsat in Medium in ein 15 ml Falcon® transferiert, abzentrifugiert (300 x g, 5 Min, 4°C) und in warmem 1 x PBS resuspendiert. Nach erneutem zentrifugieren wurde das Pellets in 5 ml warmen Trypsin (0,05% Trypsin-EDTA) resuspendiert und in eine neue Petrischale transferiert. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C im Brutschrank. Dabei wurde das Trypsin, mit sich einzeln ablösenden Zellen im 15 Min Intervall abgenommen, in einem 15 ml Falcon® gesammelt und mit kaltem FCS-haltigem Medium abgestoppt. Der Petrischale mit den verbleibenden Gewebefragmenten wurde die entsprechende Menge an frischem, warmem Trypsin zugeführt. Die abgestoppten Portionen wurden zentrifugiert (300 g, 5 Min, 4°C) der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und auf Eis gelagert. Am Ende der Inkubationszeit wurden alle Fraktionen gepoolt und in maximal 6 ml Medium in eine 75 ml Flasche überführt.

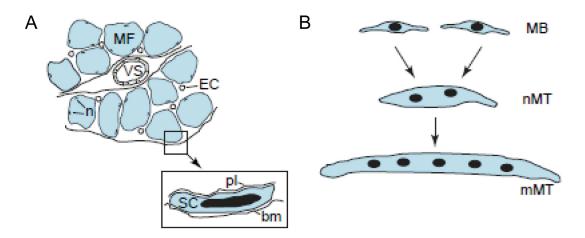


Abbildung 5: Darstellung von Gewebekomponente des Muskels in vivo und sein Zellkultursystem in vitro nach [Wiendl et al. 2005] A: Schematischer Querschnitt eines Muskels in vivo. MF: einzelne, multinukleäre Muskelfaser; n: Nukleus / Zellkern; VS: die Vaskuläre Versorgung wird durch mittelgroße Arteriolen und Venen zwischen dem Muskel sichergestellt und zwischen den Muskelfibrillen durch endomysiale Kapillare [EC]. In der Vergrößerung ist eine Satellitenzelle [SC] gezeigt, die sich elektronenmikroskopisch zwischen der Basalmembran [bm] und der Plasmamembran [pl] der Fasern finden lässt. Bei Verletzung werden diese Vorläuferzellen aktiviert, vermehren sich und können ausdifferenzieren, um den Muskel zu reparieren. Aus diesen Zellen wurden die primären Myotubenkulturen generiert. B: Muskel in vitro. Durch Subklonierung der Satellitenzellen werden die Myoblasten [MB] erhalten, aus denen sich durch Fusionierung in entsprechenden Medien Myotuben formen. Durch die zellulären gegenseitige Mechanismen der Erkennung, Adhesion, Ausrichtung Membranvereinigung entstehen naszierende Myotuben [nMT], die sich nach weiteren regulatorischen Ereignissen in ausgereifte multinukleäre Myotuben [mMT] umwandeln. In vitro weisen mMT viele Eigenschaften der Muskelfasern in vivo auf [Wiendl et al. 2005].

3.1.6.2 Myoblastenwachstum und Sub-Kultivierung

Nachdem die gewonnen Muskelzellen für 3 Tage unberührt in Kultur verblieben waren, wurden 4 ml Medium hinzugegeben. Eine Woche nach in Kulturnahme der Biopsie erfolgte der erste Mediumswechsel, anschließend dann alle (3-) 4 Tage. Die erste Teilung wurde bei 40-50% Konfluenz vorgenommen, um eine frühzeitige Differenzierung auf Grund von zu engem Zell-Zell-Kontakt zu vermeiden. Nach ca. 2 Wochen, oder bei Erreichen von 50% Konfluenz in der gesamten Flasche wurden die Zellen trypsinisiert und in die doppelte Anzahl an Flaschen aufgeteilt. Diese Sub-Kultivierung verbessert die Überlebensfähigkeit und Vermehrung der Myoblasten, die sich aus den Satellitenzellen des Muskels bilden (vgl. Abbildung 5). Gleichzeitig wird so das Ausbilden von Fibroblasten verhindert.

3.1.7 Kultivierung von Myoblasten und Myotuben auf Platten / Chamberslides

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1,0 bis 2,0 x 10^4 Zellen / cm² ausplattiert und in entsprechender Menge Medium wachsen gelassen (24 Well Platte: 500 μ l / Well; 6 Well Platte: 2-3 ml / Well). Bei Kultivierung in 8-Kammer-Objektträgern wurden die Zellen mit einer Dichte von max. 0,4 x 10^4 Zellen / Kammer ausplattiert und in 300 μ l Medium wachsen gelassen. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, wobei alle drei Tage ein Mediumwechsel vollzogen wurde.

3.1.8 Exposition von Myoblasten und Myotuben mit pro-inflammatorischen Zytokinen

Die Zellen wurden in 6 oder 24 Well Platten oder in 8-Kammer- Objektträgern bis zu einer Konfluenz von 70-80% (Myoblasten) bzw. bis zum Erhalt einer ausdifferenzierten, mehrkernigen Myotubenkultur kultiviert, bevor das Medium vollständig entfernt und die Zellen mit warmen 1 x PBS gewaschen wurden. Die Zytokine (IL-1β: 20 ng / ml; IFN-γ: 300 U / ml, TNF-α: 10 ng / ml) wurden in X-Vivo verdünnt auf die Zellen gegeben und mit diesen bei 37°C für den gewünschten Zeitraum inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium entfernt, die Zellen mit warmem 1 x PBS gewaschen und entsprechend der verwendeten Methode weiterverarbeitet.

3.1.9 Exposition von Myoblasten und Myotuben mit Inhibitoren

Die Zellen wurden entsprechend Punkt 3.1.8 wachsen gelassen. Im Anschluss an die in 3.1.8 beschriebene Zytokinbehandlung wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen, in X-Vivo verdünnt zu dem Medium gegeben und gemäß 3.1.8 weiter verfahren.

Tabelle 3: Verwendete Inhibitoren für in vitro Experimente

Inhibitor	Fima	Stock	Endkonz.
1400W	CALBIOCHEM,	100 mM	10 μΜ
(N-(3-(Aminomethyl)	Merck, Darmstadt, Deutschland		
benzyl)acetamidine)	DeatSchland		
L-NMMA		100 mM	100 μΜ
(L-N ^G -monomethyl Arginine)			
BACE1 (β-Secretase Inhibitor IV)		1 mM	500 nM
genereller Caspaseinhibitor (Q-VD-OPh)	R&D SYSTEMS GmbH, Wiesbaden Deutschland	10 mM	20μΜ

3.1.10 Vorbereitung der Kammer-Objektträger für immunzytochemische Färbungen

Nach Beendigung der gewünschten Inkubationszeit wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellen zweimal mit warmem 1 x PBS gewaschen. Die Kammer wurde entsprechend Herstellerangaben abgelöst, bevor die antikörperspezifische Fixierung erfolgte.

Fixierung:

a) Acetonfixierung (Routine):

Nach 10 Min Lufttrocknung erfolgte eine 10 Min Fixierung mit 100% Acton bei -20°C. Anschließend wurde der Objektträger erneut 10 Min Luft getrocknet bevor mit der Färbung fortgefahren, oder er bei -80°C gelagert wurde.

b) PFA-Fixierung:

Die PFA-Fixierung dient dem besseren Erhalt der Morphologie der Zellen. Allerdings können einige Epitope zerstört werden, weshalb sie nicht für jede Färbung geeignet ist. Die 10 Min Fixierung in 4 % PFA bei RT erfolgt nach 10 Min Lufttrocknung des Objektträgers. Im Anschluss an dreimaliges Waschen in 1 x PBS gewaschen wurde dieser gefärbt oder bei -80°C gelagert.

c) Methanolfixierung:

Die Durchführung erfolgte analog der Acetonfixierung, nur das anstelle von Aceton Methanol verwendet wurde.

d) PFA-Methanolfixierung:

Hierbei handelt es sich um eine Kombination aus b) und c) wobei im Anschluss an den Waschschritt in b) sofort die 10 Min Fixierung in Methanol bei –80°C erfolgt.

Diese Fixierung wird verwendet, wenn intrazelluläre Signalwege unter Erhalt der kompletten Zellmorphologie gefärbt werden sollen.

Da Aceton und Methanol die Zellmembran permeabilisieren, konnte auf zusätzliche, z.T. die Zelloberflächenepitope zerstörende, Permeabilisierungsschritte z.B. mit 0,1% Triton-X-100, oder Saponin, verzichtet werden.

3.2 Immunbiologische Methoden

3.2.1 Aufreinigung von NCAM[†] (CD56[†]) Myoblasten (Muskelvorläuferzellen / Satellitenzellen) mittels MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting)

Zum Ablösen wurden die Zellen mit warmem 1 x PBS gewaschen, in 2 ml Trypsin 1 Min bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit FCS-haltigem Medium abgestoppt. Alle Zellen wurden in einem 50 ml Falcon[®] gepoolt, pelletiert (300 x g, 5 Min, 4°C) und in 10 ml sterilem MACS-Puffer resuspendiert. Um verbleibende Gewebefragmente zu entfernen, wurden die Zellen über einen Prä-Separations-Filter gegeben, in einem 15 ml Falcon® gesammelt und die Zellzahl bestimmt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 Min wurden je 10⁷ Zellen in 80 µl MACS-Puffer aufgenommen und 20 µl der CD56⁺ MicroBeads pro 10⁷ Zellen hinzugegeben. Das Gemisch wurde 30 Min auf Eis inkubiert, bevor die Zellen mit 1-2 ml MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen gewaschen und pelletiert wurden (300 x g, 10 Min, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und bis zu 108 Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine sich im MACS-Ständer befindende, mit 3 ml MACS-Puffer equilibrierte LS-Säule gegeben. Der Durchfluss der unmarkierten Zellen wurde in einem 50 ml Falcon® gesammelt und die Säule 3 x mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule aus der Halterung genommen, auf ein 15 ml Falcon® gesetzt und 5 ml MACS-Puffer hinzupipettiert. Dieser wurde sofort mittels eines "Spritzkolben" durch die Säule gepresst. Dabei lösen sich alle markierten CD56⁺ Zellen von der Säule. Wenn die Zellzahl dieser Fraktion weniger als 1x10⁷ Zellen betrug, wurden die Zellen in maximal 3 ml entsprechendem Medium in eine 25 ml Flasche gegeben. Die unmarkierte Fraktion wurde in einer 75 ml Flasche wachsen gelassen.

Um die Reinheit der CD56⁺ Fraktion zu bestimmen, wurden die Zellen auf Kammer-Objektträgern (LabTeck II von Nunc) ausplattiert und bei ca. 90% Konfluenz für drei Tage in DMEM-Medium mit 2% Pferdeserum wachsen gelassen, um die Ausdifferenzierung zu verstärken. Die Reinheit der Kultur wurde über eine sich anschließende immunzytochemische Desminfärbung bestimmt (vgl. Methode 3.2.3), da dieses Typ 3 – Intermediärfilament als Teil des Zytoskeletts nur in den Muskelzellen nachweisbar ist. Alle Experimente wurden mit mind. 95% Desmin-positiven Myotubenkulturen durchgeführt.

3.2.2 Messung fluoreszenz markierter Zellen / Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn sie von einem Laserstrahl angeregt wird. Die Zellen streuen

einen Teil des Lichts, wobei die Menge des gestreuten Lichts mit der Größe der Zellen und mit ihrer Komplexität korreliert. Dabei ist das Vorwärtsstreulich (FSC = Forward Scatter) ein Maß für die Streuung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zellen ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewarde Scatter) ist dagegen ein Maß für die Streuung des Lichts im rechten Winkel. Dieser wird von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur des Zellkerns und der Vesikelmenge in der Zelle beeinflusst.

Parallel zum gestreuten Licht ist die Messung von Fluoreszenzfarben bei der Durchflusszytometrie möglich. Da nur wenige Zellen per se fluoreszierendes Licht emittieren, verwendet man Farbstoffe, welche an bestimmte Zellbestandteile binden. Hierbei können z.B. Farbstoffe eingesetzt werden, die in die DNA einer Zelle interkalieren, wobei über die Helligkeit der Zelle die DNA-Menge bestimmt werden kann. Aber auch Antikörper, die entweder direkt oder über einen Sekundärantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, kommen zum Einsatz. Diese sind meist gegen bestimmte Oberflächenproteine gerichtet. Nach der Markierung kann auch eine Sortierung nach diesen Merkmalen erfolgen. Über den Einsatz mehrerer Laser erhöht sich die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und somit die Informationsdichte, da eine Vielzahl von Fluoreszenzfarben gleichzeitig gemessen werden kann.

Die verwendeten Farbstoffe bzw. Antikörper sind in Tabelle 4 aufgeliste.

Tabelle 4: Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie

Farbstoff / AK	Kanal	Absorptions- Maximum	Emissions- Maximum
Alexa488 (Sekundär-AK anti-Maus / anti-Ratte)	FL1	494 nm	519 nm
Anti-AnnexinV-APC (Apoptosemarker)	FL4	655 nm	680 nm
DAF-2DA (4,5-Diaminofluorescein Diacetat) (NO-Detektor)	FL1	495 nm	515 nm
DCF-DA (5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein Diacetat) (ROS-Detektor)	FL1	504 nm	529 nm
7AAD (7-Aminoactinomycin) (Zelltodmarker)	FL3	546 nm	647 nm

3.2.2.1 <u>Markierung der Zellen mit DAF-2 DA / DCF-DA und Zelltodfärbung mit 7AAD</u> und AnnexinV-APC

Alle Experimente wurden in 24 Well Platten durchgeführt und bei einer Konfluenz von 60-80% begonnen. Am Tag der Messung betrug die Konfluenz pro Well 100%. Zwei Stunden vor Ende des Experiments wurden 2 mM DAF-2 DA / Well bzw. 20 µM DCF-DA / Well zu den Zellen gegeben bevor die finale Inkubation bei 37°C im Dunkeln erfolgte. Der Überstand wurde vorsichtig in die entsprechenden FACS-Röhrchen überführt und die Zellen nach 1 Min Inkubation bei 37°C in 200 µl Trypsin mit 500 µl kaltem DMEM-Medium abgestoppt, abgelöst und ebenfalls in die entsprechenden

Röhrchen überführt. Einem 5 Min Zentrifugationsschritt bei 300 x g, 4°C folgten zwei Waschschritte mit je 500 μ l Annexinpuffer / Röhrchen. Die Zellen wurden in 100 μ l Annexinpuffer gelöst und mit 4 μ l AnnexinV-APC 15 Min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach weiterer Zugabe von 100 μ l Annexinpuffer und 7-AAD (4 μ g / ml) erfolgte die durchflusszytrometrische Messung von 50000 *Events* / Probe über ein BD FACS Calibur mit Cell Quest Pro. Die Analyse wurde im Anschluss mit WinMDI 2.8 durchgeführt.

3.2.2.2 <u>Markierung der Zellen für Zelltodbestimmungen mittels 7AAD und AnnexinV-</u> APC

Die Markierung der Zellen für eine separate Zelltodbestimmung erfolgte analog der unter 3.2.2.1 beschriebenen Methode, allerdings unter Verzicht der Inkubation mit DCF-DA bzw. DAF-2 DA 2 h vor Ende des Experimentes.

3.2.2.3 Markierung der Zellen für MHC-I Messung

Nach Beendigung des Experimentes wurde der Überstand aus der Platte abgenommen, die Zellen vorsichtig einmal mit warmem 1 x PBS gewaschen und 1 Min bei 37°C in 200 µl Trypsin inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit 500 µl kaltem DMEM-Medium wurden die Zellen abgelöst und in die entsprechenden Röhrchen überführt. Zunächst wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 5 Min, RT), zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 45 Min Inkubation bei 4°C mit 1:500 verdünnten MHC-I Primärantikörper (vgl. Tabelle 5). Nach zwei weitern Waschschritten wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer mit 1:500 verdünnten Alexa488-gekoppelten Ziege Anti-Ratte-Sekundärantikörper resuspendiert und 30 Min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss an die Zugabe von weiteren 200 µl FACS-Puffer erfolgte die Messung über ein BD FACS Calibur mit Analyse mittels WinMDI 2.8.

3.2.3 Immunzytochemische Färbung

Die wie unter 3.1.9 beschrieben fixierten Objektträger wurden falls nötig 10 Min aufgetaut und trocknen gelassen bevor die einzelnen Kammern mit Pap-Pen umrahmt wurden. Nach 30 Min Blockierung mit einem 1:1 Gemisch aus 10% BSA: 100% Ziegenserum (bzw. Eselserum bei Verwendung von Sekundärantikörper aus Esel) folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper verdünnt in 1 x BSA über 1 h (antikörperspezifische Verdünnungen und abweichende Inkubationszeiten in Tabelle 5 aufgeführt). Anschließend wurden die Objekträger drei mal 2 Min in 1 x PBS gewaschen, bevor die 45 Min Inkubation mit dem entsprechenden

fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper erfolgte. Nach einem weiteren analogen Waschschritt wurde im Fall einer Doppelfärbung entweder eine weitere Primär— und Sekundärantikörperinkubation bzw. eine 30 Sek DAPI-Inkubation durchgeführt, der sich erneutes Waschen anschloss. Danach wurden die Objektträger kurz getrocknet, mit Fluoromount-G oder Mowiol® eingedeckt und im Dunkeln bei RT gelagert.

Alle Antikörperinkubationen erfolgten in einer dunklen, feuchten Kammer.

ThioflavinS

Die ThioflavinS Färbung diente dem Nachweis von β -Amyloid-Aggregaten. Dieses Reagenz färbt spezifisch β -Faltblattstrukturen bzw. Aggregate aus β -Faltblattanordnungen fluoreszent an, ähnlich dem Kongo-Rot in der Histochemie. Da β -Amyloid hauptsächlich in dieser Form aggregiert, wird ThioflavinS als gängiger immunfluoreszenter Nachweis von β -Amyloidplaques in der Alzheimerforschung verwendet und ist ebenfalls zum Nachweis intrazellulärer β -Amyloideinschlüsse in der Muskelforschung akzeptiert [Bussiere *et al.* 2004].

Zur Färbung wurden die Objektträger wie unter Punkt 3.1.9 beschrieben mit PFA-Methanol fixiert und anschließend dreimal 2 Min in dH₂O gewaschen. Die Färbung erfolgte für 5 Min in 1% ThioflavinS bei RT. Danach wurden die Objektträger für 5 Min in 70% Ethanol inkubiert und erneut dreimal für 2 Min in dH₂O gewaschen. Dem schloss sich die Kernfärbung mit DAPI und das Eindecken mit Fluoromount-G analog zu Punkt 3.2.3 an. Nach 24 h erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse, wobei der Fluoreszinisiothiocyanat (FITC)-Filter zur Visualisierung von ThioflavinS positiven Strukturen eingesetzt wurde (vgl. Tabelle 6).

Propidiumiodid (PI)

Die Färbung der Myoblasten und Myotuben mit PI diente der Visualisierung des Zelltodes. Dieser Farbstoff kann die porösen Zellmembranen durchdringen und ähnlich dem 7-AAD mit den Nukleinsäuren interkalieren. Intakte Zellen sind in der Lage PI aktiv auszuschleusen, dagegen verbleibt der Farbstoff in den geschädigten oder toten Zellen. Lagert sich PI an die DNA an beträgt das Absorptionsmaximum 535 nm und das Emmissionsmaximum 617 nm, was die Fluoreszenzmikroskopie der Objetträger im Taxas Red Filter ermöglicht (vgl. Tabelle 6).

Die Färbung mit PI erfolgte direkt im Medium der 8-Kammerobjekträger mit 2 μg / ml PI für 20 Min bei 37°C. Nach zweimaligem Waschen mit warmen 1 x PBS wurden die Objektträger mit mit Mowiol[®] eingedeckt und ca. 6 h später analysiert.

Tabelle 5: Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten für die Immunzytochemie

Name	Spezies	Fixierung	Verdünn- ung	Inkubation
APP (Amyloid Precursor Protein) Serotec, AHP 663	Kaninchen	Aceton	1:50	1h, RT
DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) Moleculare Probes	-	egal	1:50000	30-45sec
HLA Class I (monomorphic A,B,C); Serotec, MCA 485	Ratte	Aceton	1:200	1h, RT
iNOS; Chemicon AB5384	Kaninchen	PFA-Meth	1:500	1h, RT
IL-1β; abcam ab2105	Kaninchen	Aceton	1:100	24h, 4°C
CXCL-9 (Mig) R&D	Ziege	Aceton	1:20	1h,RT
Nitrotyrosin; upstate 06-284	Kaninchen	PFA-Meth	1:200	2h, RT
SMI31 (anti Tau); abcam ab24573-250	Maus	PFA-Meth	1:2000	1h, RT
ThioflavinS (β-Amyloidaggregationen); Sigma T1892-25G	-	PFA-Meth	1%	5min, RT
6E10 (β-Amyloid 1-17); Covance 9320-02	Maus	PFA-Meth	1:100	24h, 4°C
BACE1 (β-Secretase), Calbiochem, 195111	Kaninchen	Methanol	1:100	1h, RT
Propodiumiodid	-	keine	2 μg/ml	20min, 37°C
αB-Crystallin, Serotec, AHP-256	Kaninchen	Aceton	1:1000	1h, RT
Desmin, Abcam, ab8592	Kaninchen	Methanol		1h, RT

Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Die Untersuchung und Visualisierung der fluoreszenz markierten Zellen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M unter Verwendung von 20 x oder 40 x Objektiven, wobei die Filtereinstellungen entsprechend der Emissionswellenlänge des jeweiligen Farbstoffes verwendet wurde (vgl. Tabelle 6). Die Aufnahmen wurden mit einer hochsensitiven CCD-Kamera der Firma Intas gemacht und die jeweiligen Einstellungen für einen experimentellen Ansatz konstant gehalten.

Für die Grauwertanalyse wurden die Aufnahmen zunächst mit Irfan view invertiert und anschließend mittels Scion Immage die medianen Grauwerte bestimmt. Pro Gruppe wurden jeweils mindestens 4 Aufnahmen (20 x Objektiv) analysiert. Die statistische Auswertung wurde entweder mit GraphPad Prism oder Microsoft[®] Excel 2003 (t-Test mit gleicher Varianz) durchgeführt. Für den Vergleich unterschiedlicher Patientengruppen wurde eine zusätzliche Normierung der Kontrollexpressionswerte der einzelnen Experimente auf 100 angewandt.

Farbstoff	Verwendeter Filter	Anregungswellen-	Emissionswellen-
		länge [λ]	länge [λ]
Alexa Fluor®488	FITC	495 nm	519 nm
Alexa Fluor [®] 594	Texas Red	595 nm	613 nm
Propidiumiodid	Texas Red	595 nm	613 nm
ThioflavinS	FITC	495 nm	519 nm
DAPI	DAPI	359 nm	461 nm

3.2.3 Zelllyse zur Proteingewinnung für den Westernblot

3.2.3.1 Gewinnung von zytosolischen Proteinen

Die Zellen wurden mit kaltem 1 x PBS gewaschen und auf Eis für 40 Min mit 50-500 μl (entsprechend der Größe der Wells) Lysepuffer mit frisch hinzugegebenen Proteaseinhibitor versetzt. Mit Hilfe eines Zellschabers und mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen von der Platte entfernt und abzentrifugiert (750 x g, 10 Min, 4°C). Der Überstand wurde entweder sofort zur Proteinkonzentrationsbestimmung (3.2.4) weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

3.2.3.2 Gewinnung von membranständigen Proteinen

mittels Urea-Puffer

Die Zellen wurden mit warmem 1 x PBS gewaschen und bei RT für 10 Min mit 8 M Urea-Puffer inkubiert. Nach gründlichem Abschaben wurde das Zelllysat in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 5 Sek mit einem Ultraschall-Sonificator (auf niedrigster Stufe) behandelt, um die Viskosität zu verringern.

Anschließend wurde das Proteingemisch mittels Methanol-Chloroform-Fällung nach [Wessel and Flugge 1984] aufgereinigt und so das Proteingemisch von Detergenzien befreit. Hierfür wurden zunächst 700 µl Methanol zu der Probe gegeben und nach Mischen durch Schwenken weitere 200 µl Chloroform. Nach der Zugabe von 600 µl H₂O wurde das Gemisch abzentrifugiert (8400 x g, 5 Min, RT) und der Überstand bis zur proteinhaltigen Mittelschicht abgenommen. Im Anschluss an die erneute Zugabe von 600 µl Methanol erfolgte die Pelletierung (8400 x g, 5 Min, RT). Der Überstand wurde komplett entfernt und das Pellet getrocknet, bevor es in 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 Min bei 98°C aufgekocht wurde. Das Gemisch wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

Membranproteinextraktion mit Hypoton-Puffer

Die Zellen wurden auf Eis mit kaltem 1 x PBS gewaschen und anschließend in 50-500 μ l (entsprechend der Größe der Wells) 1 x Proteaseinhibitor–PBS-Puffer abgeschabt, bevor sie pelletiert wurden (400 x g, 5 Min, 4°C). Das Pellet wurde in 750 μ l kaltem Hypoton-Puffer resuspendiert und 10 Min auf Eis inkubiert. Durch 15-maliges Aufziehen der Suspension mit einer 1 ml Spritze mit 0,6 x 30 mm / 23G Injektionskanüle erfolgte die Homogenisierung der Zellsuspension. Durch die anschließende Zentrifugation (3000 x g, 5 Min, 4°C) wurden die Zellorganellen und das Zytoskelett abgetrennt und die Membran anschließend durch Ultrazentrifugation (14000 x g; 1 h; 4°C) aus dem Überstand isoliert. Das Membranpellet wurde in 20 – 100 μ l SDS-Probenpuffer für 5 Min bei 98°C aufgekocht. Das Gemisch wurde entweder direkt über SDS-PAGE analysiert oder bei -20°C gelagert.

3.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch nach [Bradford 1976] bestimmt, wobei eine 1:20 Verdünnung des Zelllysats photometrisch mit einem Protein-Assay-Kit analysiert wurde. Zur Kalibrierung wurden verschiedene Konzentrationen eines BSA-Standards (0 - 500 μ g / ml) verwendet und die Extinktion photometrisch bei 595 nm Wellenlänge gemessen.

3.2.5 Auftrennung von Proteinen über SDS-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [Laemmli 1970] dient der Auftrennung von Proteinen gemäß ihrem Molekulargewicht. SDS ist ein negativ geladenes, amphipatischen Detergenz, das sich an die Proteine anlagert und deren bestehende Sekundär- und Tertiärstruktur weitgehend auflöst. Durch Zugabe von β-Mercaptoethanol werden außerdem die Schwefeldisulfid-Brücken zwischen den Cysteinen gespalten. Durch die negative Ladung des SDS wandern alle Proteine zur Anode, wobei die Laufgeschwindigkeit der denaturierten Proteine umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht ist. Je höher die Acrylamidkonzentration, umso höher ist der Vernetzungsgrad des Gels und umso kleinere Proteine können aufgetrennt werden. Die verwendeten Acrylamidgele bestehen aus einem oberen Teil, dem Sammelgel, das die Geltaschen umgibt und der Konzentrierung der aufgetragenen Proteine dient, sowie dem Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgt. Durch einen pH-Unterschied von 6,8 im Sammelgel gegenüber 8,4 im Trenngel, kommt es zu einer Proteinkonzentration an der Grenze der beiden Gele, wodurch zum Anfang der Trennung eine einheitliche Startlinie zur Auftrennung der Proteine entsteht.

Zur Herstellung der Gele sowie zur Trennung der Proteine wurden Minigelsysteme der Firma *BIORAD* verwendet. Die Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele ist in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Zusammensetzung eines Mini-SDS-Gels (1,5mm)

Komponenten	Trenngel (8%)	Trenngel (10%)	Trenngel (12%)	Sammelgel
Acryl-Bisacrylamid-Lösung	1,3 ml	1,7 ml	2 ml	0,17 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8)	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, pH 6,8)	-	-	-	1,3 ml
10 % SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,01 ml
Ammoniumpersulfat (APS)	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,01 ml
dH₂O	2,3 ml	1,9 ml	1,6 ml	0,68 ml
TEMED	0,003 ml	0,002 ml	0,002 ml	0,001µl

Vor der Verwendung wurden die Glasplatten mit Isopropanol von Rückständen befreit, das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. 2 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisierung wurde der über dem Trenngel befindliche Raum mit saugfähigem Papier getrocknet, mit Sammelgel gefüllt und ein Kamm eingefügt. Nach vollständigem Aushärten des Sammelgels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Trennkammer eingesetzt. Die Kammer wurde sowohl auf der Seite der Anode, als auch auf Seite der Kathode mit Elektrophoresepuffer (1 x PAGE-Puffer) gefüllt und die Taschen mehrmals gespült. Die aufzutragenden Proben wurden in SDS-Probenpuffer für 5 Min aufgekocht, nicht gelöstes Material durch Zentrifugation (14000 x g, 1 Min) abgetrennt und anschließend 20 µg / ml Proteingemisch mit einer 50 µl Hamiltonspritze aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurden 8 µl Precision Plus Protein Standard verwendet. Die Spannung im Sammelgel betrug 70 V, die im Trenngel 120 V.

3.2.6 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Nach Autrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurden die Proteine in einer Transferkammer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen ("geblottet").

Transferaufbau:

- Anodenplatte
- Poröser Schwamm, im Transfer-Puffer aquilibriert
- Gel Blotting-Papier (SchleicherSchuell), im Transfer-Puffer aquilibriert Nitrozellulosemembran (SchleicherSchuell), im Transfer-Puffer aquilibriert
- SDS-Polyacrylamid-Gel, im Transfer-Puffer aquilibriert
- Gel Blotting-Papier (SchleicherSchuell), im Transfer-Puffer aquilibriert

- Poröser Schwamm, im Transfer-Puffer aquilibriert
- Kathodenplatte

Der Transfer erfolgte bei 100 V für 1 h bei RT.

3.2.7 Ponceau S-Färbung der Nitrocellulosemembran

Zum Nachweis des erfolgreichen Transfers sowie zur zusätzlichen Überprüfung gleicher Proteinmengen in den einzelnen Spuren wurde die Membran für 2 Min in 1 x Ponceau S-Lösung gefärbt und durch Waschen mit 1 x TBS-0,1% Tween entfärbt.

3.2.8 Immunchemischer Nachweis der Proteine

Nach erfolgtem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran 1 h bei RT in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Über Nacht bei 4°C erfolgte die Inkubation des in 1 x TBS-0,1% Tween-1% Magermilchpulver verdünnten Primärantikörpers (Tabelle 8). Nach dreimaligem Waschen der Membran in 1 x TBS-0,1% Tween wurde diese mit entsprechendem Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 8), ebenfalls in 1 x TBS-Puffer mit 1% Magermilchpulver verdünnt, 1 h bei RT inkubiert. Nach analogem Waschen erfolgte die Detektion der mit Proteine mit Hilfe der Antikörpern gekoppelten ECL (enhanced chemoluminescence) Technik nach Angaben des Herstellers und unter Verwendung von Röntgenfilmen.

Tabelle 8: Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten für den Proteinnachweis auf Nitrozellulosemembranen

Name	Firma	Spezies	Verdünnung	Inkubationszeit/Temp
6E10 (β-Amyloid 1-17)	Covance	Maus	1:250-1:500	über Nacht / 4°C
BACE1 (β-Secretase)	abcam	Kaninchen	1:50-1:100	über Nacht / 4°C
APP (Amyloid Precursor Protein) AHP 663	Serotec,	Kaninchen	1:1000	über Nacht / 4°C
GFP (green fluorescence protein)	Santa Cruze Biotechnolog y	Kaninchen	1:2500	über Nacht / 4°C
antiMaus HRP	Jackson Immuno Research	Ziege	1:10000	1 h, RT
antiKanninchen HRP	Jackson Immuno Research	Ziege	1:2000	1 h, RT

3.2.9 Auftrennung von Proteinen über Tris-Tricin-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von niedermolekularen Proteinen (β-Amyloid) erfolgte über ein Tris-Tricin-Gelsystem von [Schagger 2006].

Die Herstellung der Tris-Tricin-Gele erfolgte analog zu 3.2.5 unter Verwendung der in Tabelle 9 angegebenen Materialien. Allerdings wurde mit einem Zweipuffersystem gearbeitet, bei dem der Kathodenpuffer zwischen die Gele und der Anodenpuffer in den Außenraum gegeben wurde. Der Lauf erfolgte für mind. 2 h bei 80 V.

Der Transfer erfolge analog zu 3.2.6 allerdings bei 20 mA für 2 h.

Tabelle 9: Zusammensetzung für ein Mini-Tris-Tricin-Gel (1,5mm)

Komponenten	Sammelgel			Trenngel		
Anzahl der Gele	4 Gele	2 Gele	1 Gel	4 Gele	2 Gele	1 Gel
30 % Acrylamid - 0,8 % Bisacryl	16 ml	8 ml	4 ml	1,5 ml	0,75 ml	0,375 ml
2% Bisacrylamid	1,1 ml	0,55 ml	0,225 ml	0,066 ml	0,033 ml	0,0165 ml
3 M Tris / 0,3 % SDS ph 8,5	10 ml	5ml	2,5 m	3,1 ml	1,55 ml	0,752 ml
100 % Glycerol	2,61 ml	1,305 ml	0,65 ml	_	-	-
dH_20	-	-	_	7,9 ml	3,95 ml	2 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,2 ml	0,1 ml	0,05 ml	0,01 ml	0,005 ml	0,0025 ml
TEMED	0,02 ml	0,01 ml	0,005ml	0,1 ml	0,05 ml	0,025ml

3.2.10 Wiederherstellen (Strippen) von Nitrozellulosemembranen

Das *Strippen* der Nitrozellulosemembran soll dazu dienen bereits gebundene Antikörper zu entfernen, um einen Nachweis mit einem weiteren Primär sowie Sekundärantikörper zu ermöglichen. Dazu wurde die Membran mit 1 x Lösungen des Blot Restore Membran Rejuvenation Kits (Chemicon) entsprechend der Herstellerangaben behandelt und anschließend in 5% Magermilch in 1 x TBS-Puffer erneut blockiert. Danach wurde gemäß Punkt 3.2.8 weiterverfahren.

3.2.11 Densitometrische Auswertung

Eine densitometrische Quantifizierung der Banden auf den Röntgenfilmen ist möglich, da die Schwärzung linear zur Stärke des Lichts verläuft, welches durch die chemilumineszente Reaktion entstand. Die Grauwertuntersuchung der eingescannten Filme wurde mit dem Progemm Scion Image durchgeführt, wobei der Hintergrundwert von jedem densitometrischen Wert der Bande abgezogen wurde. Um die vorhandene Zielprotein-Menge direkt auf den Gesamtproteingehalt beziehen zu können, wurde aus dem Zielprotein-Wert und der Referenzbande (z.B. β-Actin) der Quotient gebildet.

3.2.12 Immunpräzipitation

Als Immunpräzipitation (IP) wird die Ausfällung von Antigen-Antikörper-Komplexen bezeichnet, wodurch z.B. ein bestimmtes Protein aus dem Zelllysat mittels spezifischer Antikörper isoliert werden kann.

Heutzutage werden dafür die antigenspezifischen Antikörper meist an eine Präzipitationsmatrix gekoppelt (z.B. Sepharose), dann wird diese mit der Probe inkubiert und anschließend abzentrifugiert.

Die Immunpräzipitation zur Detektion des niedermolekularen β-Amyloid wurde von Dr. Oliver Wirths (Göttingen) mit einer auf Magnetbeats-basierenden Methode durchgeführt. Hierfür wurden die Dynabeads Protein G (Invitrogen) 2 Min gevortext und 50 µl der Beats pro IP aliquotiert. Diese wurden 1 Min mit dem Magneten abgetrennt, der Überstand abgenommen und 2 x mit 250 µl Zitrat-Puffer-0,01% Tween gewaschen. Die Inkubation erfolgte unter Rotation für 45 Min bei RT in 100 µl Zitrat-Puffer zusammen mit 2,5 µl des 4G8-Antikörpers, welcher die Aminosäuren 17-24 im β-Amyloid erkennt. Nach dreimaligem Waschen mit 500 μl Zitrat-Puffer-0,01% Tween erfolgte die Inkubation mit dem Zell-Lysat unter Rotation für 1 h bei RT. Anschließend wurde das Gemisch dreimal mit 1 x PBS gewaschen, wobei bei jedem Waschschritt die Beats mit dem Magneten abgetrennt wurden. Die Beats wurden in 25 µl Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen und für 10 Min bei 95°C inkubiert bevor sie erneut mit einem Magneten abgetrennt wurden. Der Überstand wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen (4-12% VarioGel^R der Firma Anamed). Die Detektion erfolgte mit dem W0-2 Antikörper, der gegen die N-terminale Region des β-Amyloid gerichtet ist (Genetics Company, Schweiz).

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Extraktion aus humanen Myoblasten und humanen Primärmyotubenkulturen

Für die RNA-Extraktion aus der Zellkultur (24 Well-Platten) wurde das Quiagen-RNeasy Kit gemäß Herstellerangaben verwendet, wobei mit 350 μl RLT-Puffer und ohne den optionalen Zentrifugationsschritt (Punkt 10a im Kit) gearbeitet wurde. Die RNA wurde in 33 μl RNase-freiem Wasser eluiert und direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

3.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten RNA erfolgte über ein Nanodrop Spektralphotometer entsprechend der Herstellerangaben. Mittels dieser Apparatur ist es möglich eine Quantifizierung von Nukleinsäuren in sehr kleinen Volumina durchzuführen, so dass nur 1 µl der Probe eingesetzt werden mussten. In diesem Spektralphotometer wurde die RNA-Konzentration durch Messen der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt, wobei 1 µl des zum Eluieren verwendeten Wassers als Referenz diente.

3.3.3 cDNA-Synthese / reverse Transkription

Zur Synthese der zur mRNA komplementären cDNA (*complementary DNA*) wurde der SuperScriptTMII Kit entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde als Primer für diese RNA-abhängige DNA-Polymerase ein Oligo-dT-Nukleotid (10-15 Desoxythymidine), welches komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA ist, eingesetzt und über einen dNTP Mix und die reverse Transkriptase der komplementäre cDNA-Strang vervollständigt. In der sich anschließenden Reaktion wurde die Ursprungs-RNA eliminiert und eine doppelstängige cDNA gebildet. Die Lagerung selbiger erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

3.3.4 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR (RT-PCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR [Mullis and Faloona 1987]) und dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren mit zusätzlicher Quantifizierung bzw. Semi-Quantifizierung der gewonnenen DNA über Fluoreszenzmessung während eines PCR-Zykluses in "Echtzeit" (Real Time) [Gibson et al. 1996; Higuchi et al. 1993]. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge an PCR-Produkten zu und am Ende eines Laufes (bestehend aus mehreren Zyklen) kann anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignalen die relative Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen werden. Die RT-PCR wurde basierend auf dem TaqMan®-Sonden System von Applied Biosystems an einem 7500 Real-Time-PCR-System mit FAMmarkierten Primer / Proben durchgeführt. Hierbei wurde eine Sonde verwendet, an deren einem Ende sich ein Quencher, an ihrem anderen Ende der Reporterfarbstoff FAM befindet. Die verwendete Tag-Polymerase, die neben ihrer Polymeraseaktivität über eine 5'-3'-Exonuclease-Aktivität verfügt, baut die Sonde während der Synthese des Gegenstrangs am 5'-Ende ab, wodurch sich Quencher und Fluorophor von einander entfernen und die steigende Reporterfluoreszenz gemessen werden kann. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt.

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression aller im Ergebnisteil aufgeführten Marker wurden pro 20 μ l Ansatz 10 μ l PCR 2 x Mix; 8,5 μ l H₂O; 0,04 μ l ROX; 0,5 μ l cDNA und 1 μ l Primer / Probe verwendet. Im PCR 2 x Mix war die Taq-DNA-Polymerase, Magnesiumchlorid, DNA-Glykosylasen, dNTPs und Stabilisierer enthalten. Der quantifizierbare Farbstoff Carboxy-X-Rhodamin (Rox) wurde hinzugegeben, um pipettierbedingte Volumenunterschiede der PCR-Proben durch Normalisierung auf die Rox-Menge zu vermeiden.

Die RT-PCR lief entsprechend der in Tabelle 10 aufgeführten Einstellung.

Tabelle 10: Einstellung der RT-PCR

RT-PCR Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklenzahl
Initialisierung	2 Min	50°C	
Hitzeaktivierung	10 Min	95°C	
Hybridisierung	15 Sec	95°C	40
Elongation	1 Min	60°C	

Bei der Auswertung wurde die relative mRNA Expression der einzelnen analysierten Marker gegen die relative mRNA Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gemessen und verrechnet. Bei GAPDH handelt es sich um ein Enzym der Glykolyse, das in allen Proben in vergleichbaren Mengen vorkommt.

3.3.5 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion ist ein Verfahren, das es ermöglicht, exogene DNA in Empfängerzellen einzubringen. Bei der transienten Transfektion verbleibt die eingebrachte DNA in der Empfängerzelle in extrachromosomaler Form. Sie wird also nicht in das Genom eingebaut und kann somit nicht an Tochterzellen weitergegeben werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass man bereits zwei Tage nach der Transfektion eine optimale Fremd-Proteinexpression beobachten kann.

3.3.5.1 Plasmid-Transfektion mit Nanofectin

Die Transfektion von CCL136 Zellen erfolgte mit Nanofectin I. Dieses Reagenz besteht aus einem porösen Nanopartikel, sowie einem positiv geladenen Polymer, welches über eine hohe DNA-Bindungskapazität verfügt und sich zusammen mit der gebundenen Plasmid-DNA in den Nanopartikel einlagert. Darüber hinaus wird in diesem Nanopartikel-Komplex die gebundene DNA vor dem Abbau durch zytoplasmatische Nukleasen geschützt und kann leichter durch die Kernmembran transportiert werden.

Die Transfektion wurde an einer 70% - 80% konfluenten Kultur durchgeführt. Hierbei wurden die Plasmid-DNA und das Nanofectin I getrennt von einander in 150 mM NaCl verdünnt und anschließend zur Komplexbildung 20 Min bei RT zusammen inkubiert. Das Verhältnis an eingesetzter Plasmid-DNA zum Transfektionsreagenz wurde entsprechend der Wellgröße den Herstellerangaben entnommen.

Das Gemisch wurde auf den Zellen verteilt und nach 4 – 6 h erfolgte ein Mediumwechsel zur Verringerung der Zelltoxizität. Die Analyse der Zellen wurde 48 h nach der Transfektion durchgeführt.

3.3.5.2 <u>Transfektion von Myoblasten und Myotuben mit Small interfering (si)RNAs zum</u> knock-down von Genen

Die Transfektion von CCL136 Zellen sowie von humanen primären Myotubenkulturen erfolgte mit Hilfe von Nanofectin-siRNA (Transfektionsreagenz spezifisch für siRNAs), wobei mit einem siRNA: Nanofectin-siRNA Verhältnis von 1:2,5 gearbeitet wurde und die siRNA in einer Konzentration von 100 nM vorlag.

Wurde mit CCL136 Zellen gearbeitet, so erfolgte die Transfektion bei 50% Konfluenz. Im Falle der Primärzellkulturen wurde mit ausdifferenzierten, mehrkernigen Myotubenkulturen gearbeitet. Der Transfektionsansatz wurde gemäß Herstellerangaben in PBS angesetzt. Nach 20 Min Inkubation bei RT wurden die Zellen in dem für sie entsprechendemMedium transfiziert. Nach 4 h wurde entweder ein Mediumwechsel durchgeführt oder die Zellen wurden zusätzlich pro-inflammatorischen Zytokinen ausgesetzt.

Nach 12 h - 72 h wurde die *knock-down* Effizienz mittels RT-PCR, Westernblot oder immuncytochemischer Färbung bestimmt.

3.3.6 Adenovirale Infektion eukaryotischer Zellen

Rekombinante Adenoviren werden häufig dafür genutzt, fremde Gene in eine Vielzahl von Zelltypen und Geweben sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einzubringen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Viren handelte es sich um Vektoren des pAdEasy-Systems deren Herstellung zuvor durch [He *et al.* 1998] beschrieben wurde. Der adenovirale Vektor, der das Gen der APP₆₉₅ Isoform trägt (pAd-APP), wurde freundlicherweise von Dr. Mikael Simons (Göttingen) zur Verfügung gestellt und das entsprechende Kontrollvirus (pAd-GFP) stammte aus dem Labor von Prof. Dr. Jörg B. Schulz (Göttingen). Beide Virustypen wurden von Dr. Ellen Gerhard generiert und vervielfältigt. Die Generierung des Adenovirus erfolgte in *E. coli* Zellen. Durch Ko-Transformation der Bakterien mit dem pShuttle-CMV, in den zuvor das APP₆₉₅ Gen kloniert wurde sowie mit dem adenoviralen pAdEasy-1 Vektor, wurde der Adenovirus pAd-APP über

homologe Rekombination generiert. Das Kontroll-Virus pAd-GFP entstand auf gleichem Weg, durch Ko-Transformation der Bakterien mit pAdTrack-CMV und pAdEasy-1. Beide Virustypen exprimieren ihre Zielgene unter dem CMV Promotor, der in Muskelzellen aktiv ist. Entsprechend der Methode von [He et al. 1998] wurden anschließend große Mengen der adenoviralen Vektoren in HEK293 Zellen produziert. Der Titer von pAd-APP betrug 6,74 x 108 pfu (plaqueforming units) / µl und der von pAd-GFP 5,9 x 10⁹ pfu / µl. Um die Infektion der primären humanen Myotubenkulturen äquvalenten Virusmengen zu gewährleisten, wurden entsprechende Verdünnungsreihen angelegt und abhängig von der Wellgröße (8-Kammerobjektträger, 24- oder 6- Wellplatten) mit Konzentrationen von 6,0 x 10⁶ pfu / µl; 1,2 x 10⁷ pfu / µl und 1.2 x 10⁸ pfu / µl gearbeitet. Die Infektion der Myotuben erfolgte in X-Vivo-Medium, wobei die Viruslösung vorsichtig auf die Zellen pipettiert wurde. 2 h nach der Infektion wurden die Myotuben einmal mit warmem X-Vivo-Medium gewaschen und nach weiteren 22 h ggf. mit pro-inflammatorischen Zytokinen exponiert. Entsprechend des Versuchsaufbaus wurden die Zellen 48 h – 96 h nach der Infektion weiter verwendet Färbungen). (für RT-PCR, **Immunoblotting** und immunzytochemische sicherheitstechnischen Gründen erfolgten alle Arbeiten mit den Viren sowie die Weiterverarbeitung und Aufbereitung der Zellen S2 unter Bedingungen.

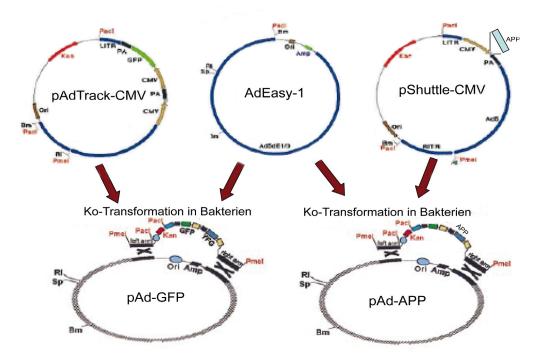


Abbildung 6: Schematische Darstellung des AdEasy Systems nach [He et al. 1998] Das Zielgen APP wurde in einen *Shuttle*-Vektor (pShuttle-CMV) kloniert. Das Plasmid wurde linearisiert und nach Ko-Transformation mit dem adenoviralen Plasmidvektor (pAdEasy-1) in Bakterien über homologe Rekombination in diesen eingebaut (pAd-APP). Das Kontrollvirus pADEG entstand analog, durch homologe

Rekombination des pAdEasy-1 mit dem Shuttle-Vektor pAdTrack-CMV, der bereits das GFP Gen trägt. Die Abbildung wurde modifiziert nach [He *et al.* 1998] entworfen.

3.3.7 Transformation von chemisch kompetenten E. coli Zellen

Die eingefrorenen, kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und je 100 μ l der Zellen mit 1 – 5 μ l Plasmid-DNA versetzt. Dieser Zell-Ansatz wurde für 30 Min auf Eis inkubiert, anschließend für 1 Min bei 42°C hitzegeschockt und auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 800 μ l S.O.C-Medium (Invitrogen) erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C. Abschließend wurden die Zellen auf Selektionsmedium (LB-Amp) ausgestrichen.

3.3.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli

Zur Identifizierung von Kolonien, in denen das gewünschte Plasmid vervielfältigt wird, kann ein Restriktionsverdau des Plasmids erfolgen, wenn passende Primer für eine PCR nicht zu Verfügung stehen.

3.3.8.1 <u>Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-und Maxi-Preparation)</u>

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des JetStar2.0-Kits. Für die Minipräparation wurden von über Nacht gewachsenen Kulturen Einzellkolonien gepickt, ein Teil auf einer Masterplatte (LB-Amp) ausgestrichen und der Rest in 3 ml LB-Amp-Selektivmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht bei 37°C auf einem Inkubationsschüttler (120 rpm). Danach wurden die Übernachtkulturen zweimal abzentrifugiert (14000 x g, 30 Sek, RT) und die erhaltenen Zell-Pellets nach Herstellerangaben für Mini-Preparationen weiterbehandelt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde bei –20°C aufbewahrt.

Die Maxipreparation erfolgte ebenfalls gemäß Herstellerangaben, allerdings aus einem Kulturvolumen von 100 ml.

4. Ergebnisse

Pathomechanismen der sporadischen Einschlusskörperchenmyositis: molekulare Interaktionen zwischen Entzündung und β-Amyloid-assoziierter Degeneration

Die Pathologie der sporadischen Einschlusskörperchenmyositis (sIBM) ist sehr komplex und zeichnet sich sowohl durch entzündliche als auch degenerative Pathomechanismen aus. Allerdings ist es bisher unklar, ob ein Zusammenhang zwischen diesen Mechanismen besteht, oder ob sie unabhängig von einander auftreten.

Mit Hilfe eines *in vitro* Modells für entzündlichen Zellstress in primären Myotubenkulturen aus nicht-pathologischem Muskel sollten mögliche molekulare Interaktionen zwischen entzündlichem Zellstress und der β-Amyloid-assoziierten Degeneration untersucht werden, um daraus gegebenenfalls neue therapeutische Ansatzpunkte bei der sIBM ableiten zu können.

Im Folgenden soll zunächst die Generierung dieses *in vitro* Modells beschrieben werden. Darauf aufbauend erfolgt die detaillierte Analyse von Zellstressreaktionen und deren ursächlichen Pathomechanismen.

Aufgrund dieser *in vitro* erzielten Ergebnisse erfolgt im letzten Abschnitt des Ergebnisteils die Analyse der Expression von entzündlichen und degenerativen Markern in primären Myotubenkulturen von sIBM-Patienten, im Vergleich zu denen von Patienten mit anderen Myopathien oder ALS / Neuropathien und nicht-pathologischen Kontrollen. Diese Untersuchungen sollen Aufschluss darüber geben, in wiefern Myotubenkulturen von sIBM-Patienten eine höhere Suszeptibilität für proinflammatorische Stimuli aufweisen.

4.1 Generierung eines *in vitro* Modells für entzündlichen Zellstress im Muskel

Zur Generierung des *in vitro* Modells für entzündlichen Zellstress im nichtpathologischen Muskel wurden primäre Myotubenkulturen entsprechend der in Abschnitt 3.1.6 und 3.2.1 dargestellten Methode angelegt. Da die Kultivierung von Primärzellkulturen aufwendig ist, wurde insbesondere für Vorabtestungen und Methodenetablierungen parallel auch mit einer Myoblasten-Zelllinie

(Rhabdomyosarkomazellen, CCL136, hier als Myoblasten bezeichnet) gearbeitet. Alle im Folgenden aufgeführten Experimente wurden mindestens dreimal sowohl an den Myoblasten als auch an nicht-pathologischen primären Myotubenkulturen wiederholt. Lediglich die durchflusszytometrischen Untersuchungen mussten aus technischen Gründen auf Myoblasten beschränkt bleiben. Diese Untersuchung ist an ausdifferenzierten und fusionierten Myotuben nicht oder nur schwer möglich, da es zur Verklumpung der Zellen kommt, wodurch die Ergebnisse stark fehlerbehaftet waren.

4.1.1 Entzündliche Signalkaskaden nach Exposition der Myotubenkulturen mit pro-inflammatorischen Zytokinen

Die nicht-pathologischen primären Myotubenkulturen wurden für 12 h - 72 h unterschiedlichen Kombinationen der pro-inflammatorischen Zytokine (20 ng / ml), IFN-y (300 U / ml) und TNF-α (10 ng / ml) ausgesetzt. Im Anschluss erfolgte die Expressionsanalyse von Entzündungs-assoziierten Mediatoren, die in der sIBM eine grundlegende Bedeutung spielen. Hierzu zählt z.B. CXCL-9, welches zu den am stärksten hochregulierten Chemokine bei der sIBM und anderen entzündlichen Myopathien gehört, sowie IL-1β, welches von Muskelzellen selbst produziert werden kann und dem eine zentrale pathophysiologische Rolle im entzündlichen Muskel zukommt [Dalakas 1998; Figarella-Branger et al. 2003]. Mittels Real-Time-PCR (RT-PCR), bei der die relative Expression des jeweiligen Zielgens in Relation zu GAPDH gemessen wurde, zeigte sich bereits 12 h und 36 h nach Exposition mit proinflammatorischen Zytokinen eine signifikante (*p<0,05) Hochregulation der mRNA Expression von CXCL-9 im Vergleich zu unbehandelten Myotuben (Abb. 7 A). Auch für das pro-inflammatorische Zytokin IL-1β konnte eine ähnliche Überexpression auf der mRNA Ebene gezeigt werden (Abb. 7 A). Die mRNA Expression von IL-1β nahm insbesondere durch die Inkubation mit Zytokinkombinationen die IL-1β enthielten zu, was eine auto-Induktion von IL-1β darstellt.

Nach prolongierter Exposition der Myotuben mit pro-inflammatorischen Zytokinen über 40 h und 72 h konnte schließlich mittels immunzytochemischer Färbung eine hochsignifikante Überexpression von CXCL-9 (***p<0,001) auch auf der Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 7 B). In ähnlicher Weise führten diese pro-inflammatorischen Bedingungen ebenfalls zur Überexpression von IL-1β und analog der mRNA Expression zeigten vor allem Kombinationen mit IL-1β und TNF-α einen Effekt (**p<0,01) (Abb. 7 B).

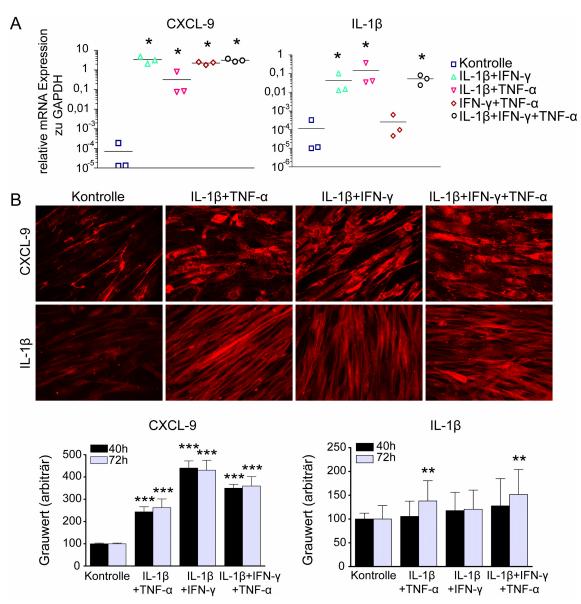


Abbildung 7: Expression von CXCL-9 und IL-1 β in nicht-pathologischen Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Exposition von Myotubenkulturen mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml); n=3 / Gruppe. A: Analyse der mRNA-Expression von CXCL-9 und IL-1 β in Relation zu GAPDH nach 12 h. B: Repräsentative immunzytochemische Färbungen auf CXCL-9 und IL-1 β nach 72 h, sowie quantitative Grauwertanalyse der Färbungen nach 40 h und 72 h (**p<0,01; ***p<0,001). Die Aufnahmen in B wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.1.2 Überexpression von MHC-I nach Exposition von Myotubenkulturen mit pro-inflammatorischen Zytokine

Es ist bekannt, dass der MHC-I Komplex auf den Fasern der sIBM-Patienten stark überexprimiert wird. Dieser antigenpräsentierende Proteinkomplex trägt vor allem Spaltprodukte körpereigener im Proteasom gebildeter Proteine. Aber auch

"körperfremde" Peptide, die von Virusinfektionen oder Mutationen abstammen, werden als Teil des MHC-I präsentiert und aktivieren so zytotoxische T-Lymphozyten, die in Folge dessen die Zellen angreifen und vernichten. Diese, bei sIBM-Patienten vorzufindende MHC-I-Überexpression gibt somit zum einen den Hinweis auf die Beteiligung des Immunsystems und ist darüber hinaus Bestandteil des sogenannten endoplasmatischen Retikulumstresses [Delaunay et al. 2008].

Die Exposition von nicht-pathologischen Myotubenkulturen mit IL-1β, IFN-γ und TNF-α bewirkte im in vitro Modell bereits nach 12 h die Induktion der MHC-I mRNA Expression. Nach 36 h war die relative MHC-I mRNA Expression unter Behandlung mit allen drei Zytokinen sogar signifikant (*p<0,05) erhöht im Vergleich zu unbehandelten Myotuben (Abb. 8 A). Dies könnte auf einem superadditativen Effekt beruhen, den die Zytokine aufeinander auswirken. Vor allem in Abwesenheit von IL-1β zeigte sich keine wesentliche Änderung im mRNA Spiegel. In der analogen immunzytochemischen 40 h und 72 h nach Exposition der Myotubenkulturen mit inflammatorischen Zytokinen zeigte sich eine deutliche Proteinüberexpression. Die MHC-I Zunahme ähnelte sich unter allen Zytokinkombinationen, was möglicherweise auf einer begrenzten translationalen Modulation beruhen kann (Abb. 8 B). Die im Anschluss erfolgte statistische Grauwertuntersuchung der Proteinexpression von MHC-I verdeutlicht die signifikante Hochregulation (**p<0,01 bis ***p<0,001) (Abb. 8 C), sowie eine bis 4-fache MHC-I Signalzunahme. zu durchflusszytometrische Analyse der Myoblasten bestätigte nochmals den Anstieg von MHC-I auf der Zelloberfläche. Nach 72 h Exposition mit Kombinationen von IL-1β, IFN-y und TNF-α waren 50,3% +/- 2,5% für MHC-I positive Myoblasten im Vergleich zu 2,6% +/- 0,09% MHC-I positiven unbehandelten Myoblasten zu verzeichnen (Abb. 8 D).

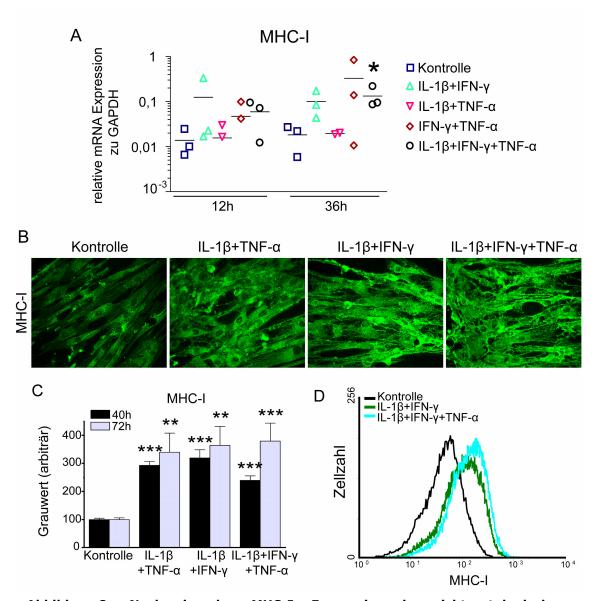


Abbildung 8: **Nachweis** der MHC-I **Expression** in nicht-patologischen Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Exposition von nicht-pathologischen Myotuben mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF-a (10 ng / ml); n=3 / Gruppe. A: Analyse der mRNA Expression MHC-I relativ zu GAPDH nach 12 h und 36 h. B: repräsentative immunzytochemische Färbungen auf MHC-I 72 h nach Zytokinexposition. C: quantitative Grauwertanalyse nach 40 h und 72 h (**p<0,01; ***p<0,001). D: Overlay-Histogramm der durchflusszytochemischen Analyse der MHC-I Oberflächenexpression auf Myoblasten 72 h nach Zytokinexposition. Die Aufnahmen in B wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.1.3 Proteinakkumulationen von β-Amyloid-assoziierten Molekülen nach Exposition von Myotubenkulturen mit pro-inflammatorischen Zytokinen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen entzündlichem Zellstress und der Akkumulation von β -Amyloid in Muskelzellen zu untersuchen, erfolgte die Analyse degenerations-assoziierter Proteine im Zellkulturmodell primärer Myotuben unter proinflammatorischen Bedingungen. Dafür wurden die nicht-pathologischen Myotubenkulturen über einen Zeitraum von 12 h - 72 h analog zu 4.1.1 mit unterschiedlichen Kombinationen der Zytokine IL-1 β , IFN- γ und TNF- α versetzt und anschließend die Expression von APP auf mRNA und Proteineben bestimmt.

APP spielt bei der sIBM vermutlich eine zentrale Rolle, da es das Vorläuferprotein des β-Amyloid ist, welches zu dem vorherrschendem Protein in den Einschlüssen von sIBM-Patienten zählt (siehe Kapitel 1.2.2.1, Einleitung).

Obwohl mittels RT-PCR keine Veränderungen in der Genexpression von APP relativ zu GAPDH nach 12 h und 36 h Exposition mit pro-inflammatorischen Zytokinen detektiert werden konnte (Abb. 9 A), zeigte sich in der immunzytochemischen Färbung nach 40 h und 72 h eine signifikante (*p<0,05 bis **p<0,001) Überexpression des Proteins (Abb. 9 B und C). Die Westernblotanalysen belegen die Expressionszunahme der reifen, vollständig glykosylierten Form von APP (ca. 130 kDa) im Zeitverlauf. Allerdings war diese nur im entzündlichen Milieu zu finden (Abb. 9 D). In den unbehandelten Kulturen konnte unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen keine APP Expression nachgewiesen werden.

Die Überexpression von APP unter pro-inflammatorischen Bedingungne hatte im weiteren Verlauf auch eine signifikante Akkumulation von β -Amyloid (bis **p<0,001) zur Folge, wie mittels immunzytochemischer Färbung mit einem monoklonalen β -Amyloid–spezifischen Antikörper (6E10, spezifisch für ein Epitop im Bereich der Aminosäuren 1 - 17 der β -Amyloidsequenz) gezeigt werden konnte (Abb. 10 A und B). Darüber hinaus konnte in der zytochemischen Färbung mit dem Reagenz ThioflavinS auch die pathologische Aggregation von β -Amyloid, bedingt durch pro-inflammatorische Zytokine, nachgewiesen werden. Dieses Reagenz färbt β -Faltblattstrukturen von Proteinen bzw. Aggregate davon an und ist zum Nachweis intrazellulärer β -Amyloideinschlüsse in der Muskelforschung etabliert [Bussiere *et al.* 2004].

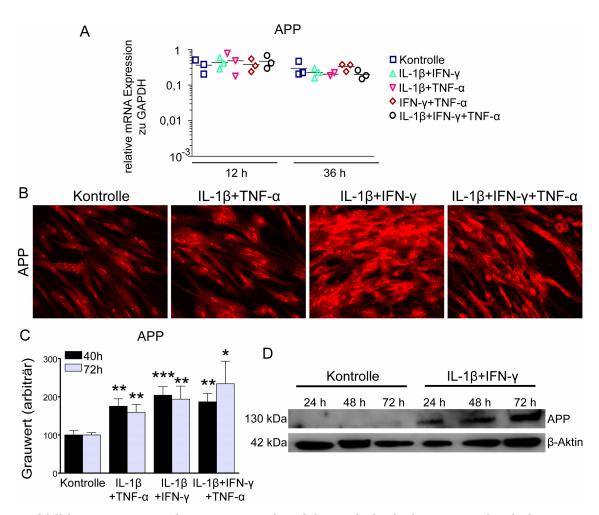


Abbildung 9: Expression von APP in nicht-pathologischen Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Exposition von nicht-pathologischen Myotuben mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml); n=3 / Gruppe. A: Analyse der mRNA Expression von APP relativ zu GAPDH nach 12 h und 36 h. B: repräsentative immunzytochemische Färbungen auf APP nach 72 h Zytokinexposition. C: quantitative Grauwertanalyse der Färbungen nach 40 h und 72 h (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). D: der Westernblot zeigt die zeit- und zytokinbedingte Zunahme von APP nach 24 h, 48 h und 72 h. Die gleichbleibende Proteinmengen wurden durch β -Aktin bestätigt. Die Aufnahmen in B wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

Zur zusätzlichen Bestätigung, dass es sich um β -Amyloid-spezifische Aggregate handelt, wurde ein spezieller Immunoblot für niedermolekulare Proteine mittels Tris-Tricin-Gel durchgeführt. Dabei wurde der gleiche Antikörper (6E10) wie bei den immunzytochemischen Färbungen verwendet. Auch mit dieser Methode konnte eine Zunahme an APP-Spaltprodukten unter pro-inflammatorischen Bedingungen gezeigt werden (Abb. 10 C). Da der Antikörper in der N-terminalen Region des β -Amyloids bindet, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um Dimere (ca. 8 kDa) und / oder Oligomere des β -Amyloidproteins, bzw. um β -CTF-Fragmente des APPs handelt (vgl. Abb. 4 in der Einleitung). Für die alleinige Detektion des kleinen β -Amyloidproteins

(4 kDa) war diese Methode jedoch nicht sensitiv genug, bzw. lag die Konzentration an reinem β-Amyloid in den Myotuben unter der Methoden-spezifischen Nachweisgrenze. Aus diesem Grund wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt, welche die Entzündungs-bedingte Zunahme von β-Amyloid belegen konnte (Abb. 10 D).

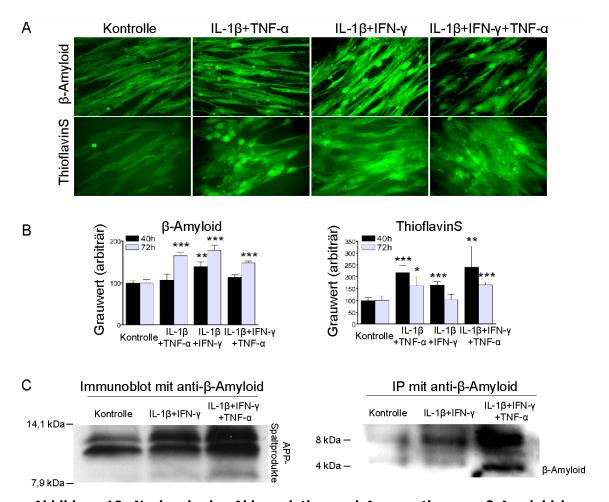


Abbildung 10: Nachweis der Akkumulation und Aggregation von β-Amyloid in nicht-patologischen Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Exposition von nicht-pathologischen Myotuben mit Kombinationen von IL-1β (20 ng/ml), IFN- γ (300 U/ml) und TNF-a (10 ng/ml); n=3/Gruppe. A: repräsentative immunzytochemische Färbung auf Akkumulationen von β-Amyloid mit dem monoklonalen AK 6E10 sowie zytochemischer Nachweis von β-Amyloid-Aggregaten mit ThioflavinS 72 h nach Zytokinexposition. B: quantitative Grauwertanalyse nach 40 h und 72 h (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). C: Immunoblot zum Nachweis von β -Amyloid mittels des monoklonalen AK 6E10 nach 72 h Zytokinexposition. Um die Sensitivität für niedermolekulare Proteine zu erhöhen, wurden sie zuvor in einem Tris-Tricin Gel aufgetrennt. D: Zum Nachweis von β-Amyloid wurde eine Immunpräzipitation mit dem monoklonalen AK 4G8 durchgeführt sowie anschließende Auftrennung der Proteine in einem 4-12% VarioGel^R. Die Detektion erfolgte mit dem W0-2 AK, der gegen die N-terminale Region des β-Amyloid gerichtet ist. Die Aufnahmen in A wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.1.4 Analyse der Expression von αB-Crystallin und phosphoryliertem Tau / Neurofilament nach Exposition von Myotubenkulturen mit proinflammatorischen Zytokinen

Neben APP und β-Amyloid spielen vermutlich auch andere Degenerations-assoziierte Proteine eine Rolle bei der sIBM. So ist bekannt, dass phosphoryliertes Tau / Neurofilament im Muskel der Patienten mit sIBM überexprimiert wird [Mirabella et al. 1996; Askanas et al. 1994]. In dem in dieser Arbeit etablierten in vitro Modell für entzündlichen Zellstress konnte nach 40- und 72-stündiger Exposition mit den Zytokinen IL-1 β , IFN-y und TNF- α ebenfalls eine signifikante (**p<0,01 bis ***p<0,001) Überexpression phosphoryliertem Tau / Neurofilament von in primären Myotubenkulturen nicht-pathologischer Muskeln detektiert werden. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen verdoppelte sich deren Signalintensität (Abb. 11 B und C), wobei sich Ko-lokalisationen mit dem Zellkern zeigten, aber auch ein zytoplasmatischer Anstieg nachweisbar war.

Im Muskel von sIBM-Patienten ist aber nicht nur die Expression von Degenerations-assoziierten Mediatoren gesteigert, sondern es finden sich auch vermehrt Marker für intrazellulären Zellstress [Banwell and Engel 2000]. Ein solcher ist z.B. αB-Crystallin. Dieses Hitzeschockprotein bewirkt, dass Eiweiße unter vermehrtem Zellstress ihre Struktur beibehalten, indem es sie beispielsweise vor Denaturierung schützt. Auf der anderen Seite kann es den Abbau funktionsunfähiger Proteine durch das Proteasom beschleunigen.

In diesem *in vitro* Modell induzierte die 12- und 36-stündige Exposition der primären Myotubenkulturen mit den pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β, IFN-γ und TNF-α keine Veränderung der mRNA Expression von αB-Crystallin. Die analog zur mRNA Expressions-Analyse durchgeführten immunzytochemischen Färbungen 40 h und 72 h nach Zytokinexposition erbrachten dagegen eine deutliche Proteinüberexpression (**p<0,01), wobei sich in der Grauwertanalyse die Intensität des αB-Crystallinsignals z.T. verdoppelte.

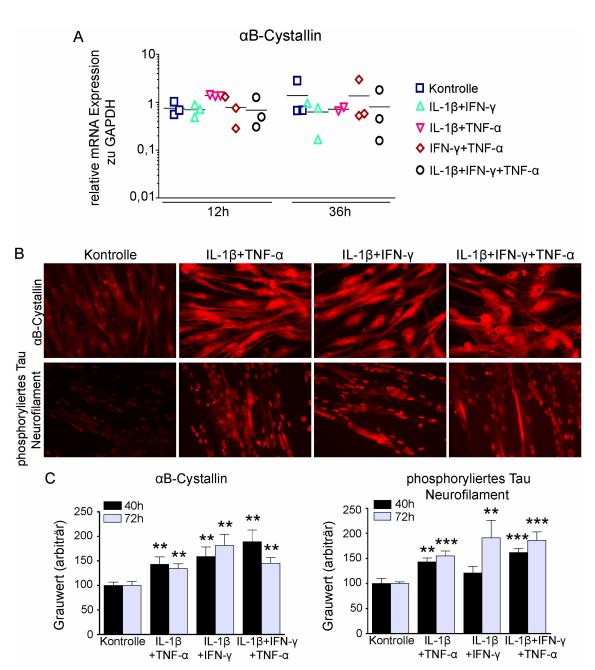


Abbildung 11: Nachweis der zytokinbedingten Überexpression aB-Crystallin und phosphoryliertem Tau / Neurofilament. Exposition von nichtpathologischen Myotubenkulturen mit Kombinationen von IL-1β (20 ng / ml), IFN-γ (300 U / ml) und TNF-a (10 ng / ml); n=3 / Gruppe. A: Analyse der mRNA Expression von aB-Crystallin relativ zu GAPDH nach 12 h und 36 h. B: repräsentative immunzytochemische Färbungen auf aB-Crystallin und phosphoryliertes Tau / Neurofilament 72 h nach Zytokinexposition. C: quantitative Grauwertanalyse nach 40 h und 72 h (**p<0,01; ***p<0,001). Die Aufnahmen in B wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.2 NO-assoziierter Zellstress unter pro-inflammatorischen Bedingungen

Neben der Überexpression von entzündlichen und degenerativen Mediatoren zeichnet sich die sIBM auch durch die Hochregulation von iNOS aus.

Im Folgenden soll nun der Einfluss entzündlicher Mechanismen auf den NOassoziierten Zellstress *in vitro* untersucht werden.

Hierbei konnte in den nicht-pathologischen primären Myotubenkulturen keine Expression von iNOS auf der mRNA Ebene nachgewiesen werden (Abb. 12 A). Allerdings zeigte sich bereits nach 12-stündiger Inkubation mit Zweifachkombinationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IFN- γ und TNF- α eine signifikante (*p<0,05) Hochregulation der iNOS mRNA, wobei die Kombination aus IL-1 β und IFN- γ den stärksten Effekt hatte (Abb. 12 A). Nach 36 h wurden ähnliche Ergebnisse für die mRNA Expression erzielt (nicht abgebildet).

Experimenten komplementären erfolgte 40 h 72 h die nach und immunzytochemische Analyse. Hierbei konnte auch auf der Proteinebene unter proinflammatorischen Bedingungen eine signifikante (**p<0,01 bis ***p<0,001) iNOS Überexpression gezeigt werde, die fast bis zur Signalverdopplung führte (Abb. 12 B). Diese Daten stehen im Einklang mit ex vivo Untersuchungen, in denen im Muskel von sIBM Patienten im Vergleich zu nicht-myopathischen Muskel eine weitaus höhere iNOS mRNA- und Proteinexpression aufgezeigt werden konnte, wodurch es zu einer vermehrten Nitrierung von Tyrosinresten im Gewebe der sIBM Patienten kam (Daten nicht abgebildet).

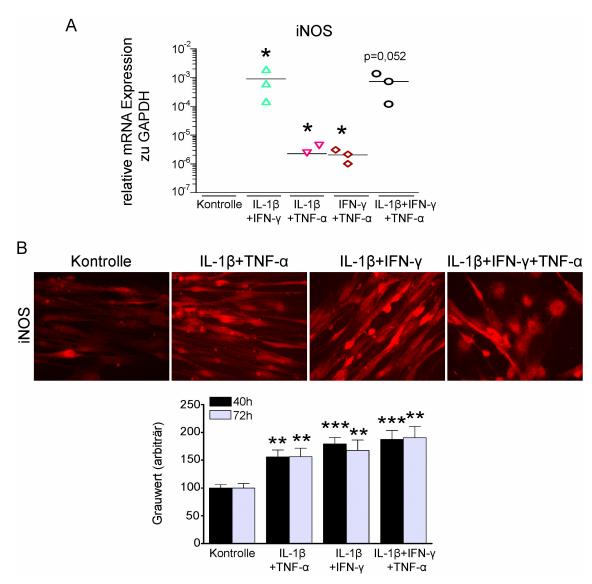


Abbildung 12: Induktion von iNOS in nicht-pathologischen Myotubenkulturen durch pro-inflammatorische Zytokine. Exposition von Myotubenkulturen mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml); n=3 / Gruppe. A: Dargestellt ist die mRNA Expression von iNOS in Relation zu GAPDH nach 12 h. B: repräsentative immunzytochemische Färbungen auf iNOS nach 72 h, sowie quantitative Grauwertanalyse (**p<0,01; ***p<0,001) der Färbungen nach 40 h und 72 h. Die Aufnahmen in B wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.2.1 Immunzytochemische Analyse von NO-Stress

Die Überproduktion von NO spielt vermutlich eine wichtige pathologische Rolle bei diversen degenerativen und entzündlichen Erkrankungen [Barohn *et al.* 1995;Dau 1987;Kelly, Jr. *et al.* 1986] und kann auch bei der sIBM von Bedeutung sein (eigene *ex vivo* Untersuchungen, nicht abgebildet). Zusammen mit Hyperoxid formt NO das hoch

reaktive Radikal Peroxinitrit, welches wiederum Tyrosinreste in Zellen nitriert und so Proteine und Membranen schädigt.

In den immunzytochemischen Färbungen mit anti-Nitrotyrosin zeigte sich in den hier angelegten nicht-pathologischen Myotubenkulturen analog zur Überexpression von iNOS auch eine Zunahme an nitrierten Tyrosinen im pro-inflammatorischen Milieu. Insbesondere die gleichzeitige Exposition mit IL-1β und IFN-γ führte zu einem statistisch signifikanten (*p<0,05) Anstieg des Signals (Abb. 13).

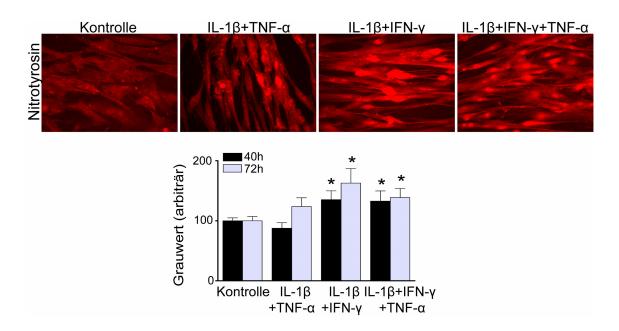


Abbildung 13: Immunzytochemischer Nachweis von Nitrotyrosin in nichtpathologischen Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Exposition von Myotubenkulturen mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml); n=3 / Gruppe. Dargestellt sind repräsentative immunzytochemische Färbungen auf Nitrotyrosin nach 72 h, sowie die quantitative Grauwertanalyse (*p<0,05) der Färbungen nach 40 h und 72 h. Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.2.2 Durchflusszytrometrische Analyse der ROS- und NO-Produktion

Nachdem wir immunzytochemisch zeigen konnten, dass die Aktivität des iNOS / NO-Systems in primären Myotubenkulturen von nicht-pathologischem Muskel unter inflammatorischen Bedingungen gesteigert ist, erfolgte die durchflusszytometrische Validierung. Hierfür wurde sowohl die Bildung freier Sauerstoffradikale (ROS) im Allgemeinen bestimmt sowie die spezifische NO-Produktion.

Zur Detektion von ROS in den Zellen wurde Dichlorodihydrofluorescein (DCFH)diacetat (DA) verwendet, welches in die Zellen eindringt und durch Esterasen in DCFH

hydrolysiert wird. In Anwesenheit von ROS (zB. NO, O^{2-} und H_2O_2) erfolgt dann die Umwandlung in das stark fluoreszente DCF (2,7-Dichlorofluorescein).

Bereits nach 48-stündiger Exposition mit unterschiedlichen Kombinationen der Zytokine IL-1 β , IFN- γ und TNF- α konnte eine Verdopplung der ROS-Produktion ermittelt werden. Diese stieg nach 72 h weiter an. Durch genauere Analyse des Seitwärtsstreulichts (sightwards scatter, SSC, vgl. Methode 3.2.2) gegen das DCF-Signal zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität und demzufolge die ROS-Produktion mit einer Zunahme an vergrößerten und granulärer erscheinenden Zellen einhergeht. Diese Beobachtung kann ein Indiz dafür sein, dass die vermehrte ROS-Produktion dem Zelltod vorausgeht (Abb. 14).

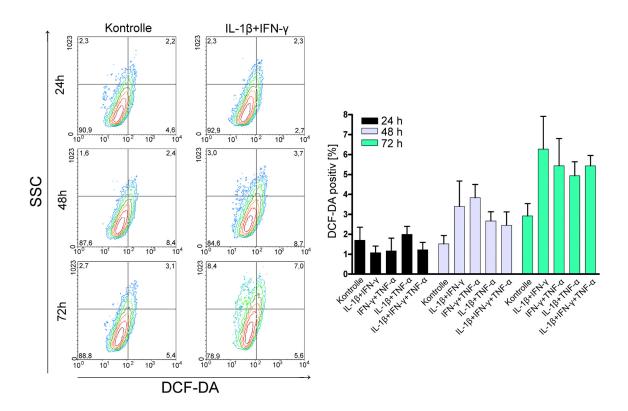


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse der ROS-Produktion in Myoblasten unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Myoblastenkulturen wurden für 24 h - 72 h mit IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF-a (10 ng / ml) inkubiert. Die Konturblots (links) zeigen die DCF-DA Färbungen gegen den SSC aufgetragen. Die quantitative Auswertung (rechts) zeigt den Prozentsatz an DCF-DA positiven Zellen entsprechend des oberen rechten Quadranten der Konturblots; dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus n=3 Experimenten.

Zur spezifischen Detektion von intrazellulär gebildeten NO erfolgten in analoger Weise durchflusszytometrische Analysen mit dem zellmembranpermeablen Farbstoff 4,5-Diaminofluorescein-(DAF-2) Dieacetat. Dieser wird ebenfalls von intrazellulären

Ergebnisse 66

Esterasen in DAF-2 umgewandelt, welches aufgrund seiner geringen Permeabilität in den Zellen verbleibt. Wird in der Zelle NO zu Nitrit in Anwesenheit von O₂ oxidiert, reagiert DAF-2 mit einem Intermediat über N-Nitrosierung zu dem stark fluoreszenten Triazolofluorescein (DAF-2T).

Auch bei der spezifischen Analyse auf NO zeigte sich eine Zunahme des Fluoreszenssignals nach 72 stündiger Inkubation mit den genannten Zytokinen. Im Vergleich zu dem zuvor verwendeten Indikator, konnte über DAF-2 eine ausgeprägtere NO-Bildung nachgewiesen werden (Abb. 15).

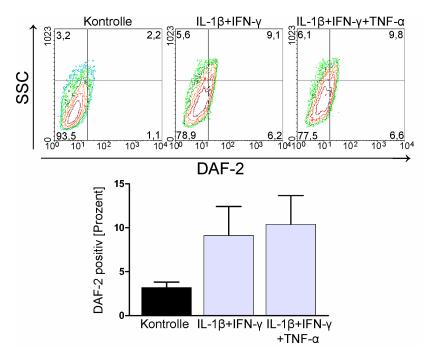


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der NO-Produktion in Myoblasten unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Myoblastenkulturen wurden für 72 h mit IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml) inkubiert. Die Konturblots (oben) zeigen die DAF-2 Färbungen gegen den SSC aufgetragen. Die quantitative Auswertung (unten) zeigt den Prozentsatz an DAF-2 positiven Zellen entsprechend des oberen rechten Quadranten der Konturblots; die Mittelwerte + SD aus n=4 Experimenten sind dargestellt.

4.2.3 Inhibition der NO Produktion

Um zu überprüfen, ob die unter 4.2.2 gezeigte vermehrte Nitrierung von Tyrosinresten unter pro-inflammatorischen Bedingungen tatsächlich auf der iNOS-bedingten NO-Bildung beruht, kamen verschiedene NOS-Inhibitoren zum Einsatz. Dabei handelte es sich um den nicht selektiven NOS-Hemmer L-NMMA, sowie um 1400W, einen irreversiblen iNOS-spezifischen Inhibitor. Letzterer hat eine 1000-fach höhere Selektivität für iNOS als L-NMMA und weist eine 50- bis 100-fach größere Potenz auf.

Analog zu den zuvor durchgeführten Experimenten wurden die Myoblasten bis zu 72 h mit unterschiedlichen Kombinationen der Zytokine IL-1β, IFN-γ und TNF-α sowie mit den NOS bzw. iNOS-Inhibitor inkubiert. Da die Halbwertzeiten beider Inhibitoren relativ kurz sind [Garvey *et al.* 1997;Frey *et al.* 1994;Bogle *et al.* 1992], wurden sie alle 24 h in der Kultur erneuert. Hierbei wurde L-NMMA mit einer Konzentration von 100 μM, 1400W mit 10 μM verwendet. Die anschließende immunzytochemische Analyse mittels Nitrotyrosinfärbung zeigte eine deutliche Reduktion in der Nitrierung von Tyrosinresten innerhalb der Zellen, sowohl nach Gabe von L-NMMA (**p<0,01; nicht abgebildet) als auch nach Inkubation mit 1400W. Allerdings war der Effekt nach der iNOS-spezifischen Blockade deutlich stärker ausgeprägt (***p<0,001). Darüber hinaus bewirkte die Inkubation mit 1400W bereits unter Kontroll-Bedingungen eine verminderte Nitrierung (*p<0,05). Diese Daten belegen erneut die iNOS-abhängige NO Produktion in unserem Muskelzellsystem unter pro-inflammatorischen Bedingungen (Abb. 16).

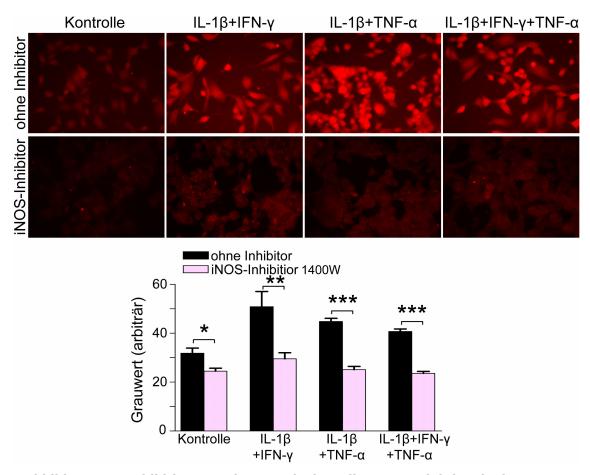


Abbildung 16: Inhibition von iNOS reduziert die NO-Produktion in humanen Myoblasten unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Dargestellt sind die repräsentativen Färbungen auf Nitrotyrosin in Myoblasten nach 72 h Exposition mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml) in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des spezifischen iNOS Inhibitors 1400W; n=3 / Gruppe. Quantitative Auswertung mittels Grauwertanalyse (unten); *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

Ergebnisse 68

Komplementär zu den immunzytochemischen Färbungen auf Nitrotyrosin wurde in durchflusszytometrischen Analysen der Prozentsatz an DAF-2 positiven Zellen nach Inhibition mit L-NMMA bzw. 1400W ermittelt. Die Inkubation erfolgte analog der Immunzytochemie. Hierbei zeigte sich im inflammatorischen Milieu nach 72 h eine deutliche Zunahme der DAF-2 positiven Zellen von 4% */- 0,7% auf bis zu 13% */- 5,8% (ermittelt für die Kombination von IL-1β+IFN-γ+TNF-α: *p<0,05) wie sie zuvor unter Punkt 4.2.3 beschrieben wurde. Dagegen zeigte sich mit dem unspezifischen NOS-Inhibitor L-NMMA bereits ein Trend zur verminderten NO-Produktion unter entzündlichen Bedingungen. Erfolgte die Blockierung mittels des iNOS-spezifischen Inhibitors 1400W war die NO-Produktion schon unter Kontrollbedingungen signifikant (*p<0,05) reduziert und der Zytokin-bedingte NO-Anstieg konnte deutlich vermindert werden (Abb. 17).

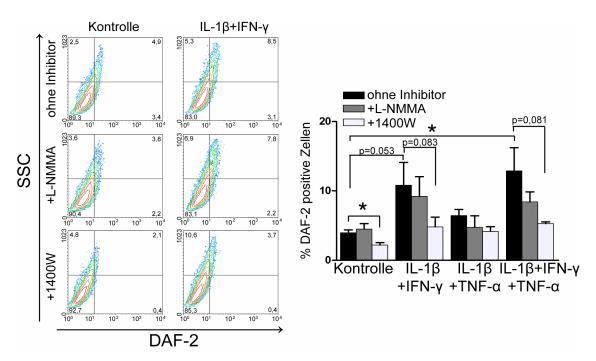


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Untersuchung der NO-Produktion nach Inhibition von iNOS in humanen Myoblasten. Durchflusszytometrische Analyse des intrazellulär gebildeten NO über den Nachweis DAF-2 positiver Zellen. Die Myoblasten wurden für 72 h mit Kombinationen der Zytokine IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF-a (10 ng / ml) in An- bzw. Abwesenheit des NOS-Inhibitors L-NMMA bzw. des iNOS Inhibitors 1400W behandelt. Diese wurden alle 24 h hinzugegeben; n=3 / Gruppe. Die Konturblots (links) zeigen die DAF-2 Färbungen gegen den SSC aufgetragen. Die quantitative Auswertung (rechts) zeigt den Prozentsatz an DAF-2 positiven Zellen, entsprechend des oberen rechten Quadranten der Konturblots; dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus drei Experimenten.

Ergebnisse 69

4.2.4 Zelltoduntersuchungen unter pro-inflammatorischen Bedingungen

Reaktive Sauerstoffspezies (z.B. NO) führen u.a. zur Schädigung biologischer Membranen sowie von Proteinen und DNA und können so Zelltod induzieren. Anhaltspunkte, dass dies auch in unserem *in vitro* Modell zutrifft, ergaben sich bereits aus der durchflusszytometrisch ermittelten Zunahme der SSC-positiven Zellen unter pro-inflammatorischen Konditionen (vgl. Abb. 14). Aus diesem Grund untersuchten wir nun den direkten Einfluss von NO auf die Morphologie der Myoblasten. Dazu wurden diese mit ansteigenden Konzentrationen (125 μM, 250 μM und 500 μM) des NO-Donors DETA-NONOate für bis zu 96 h behandelt. In der anschließenden lichtmikroskopischen Analyse der Myoblasten fanden sich Hinweise auf Zellnekrose wie z.B. ein Anschwellen des Zellkörpers und verstärkte Granularität (Abb. 18 oben). Interessanterweise waren die gleichen morphologischen Veränderungen nach Inkubation der Myoblasten mit pro-inflammatorischen Zytokinen zu beobachten, vor allem wenn diese mit IL-1β und IFN-y behandelt wurden (Abb. 18 unten).

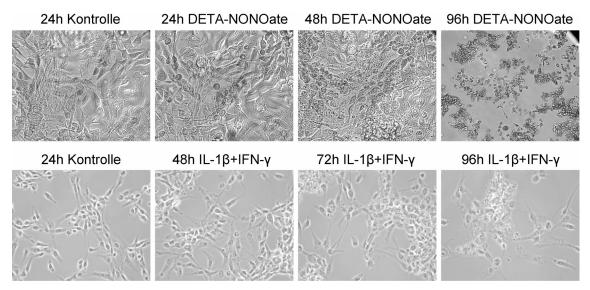


Abbildung 18: Morphologische Untersuchung der Myoblasten nach Behandlung mit NO-Donor oder pro-inflammatorischen Zytokinen. Sowohl nach Gabe des synthetischen NO-Donors DETA-NONOate (250 $\mu\text{M})$ (oben), als auch durch Inkubation mit IL-1 β (20 ng / ml) und IFN- γ (300 U / ml) (unten) konnten ähnliche morphologische Veränderungen, die auf einen nekrotischen Zelltod hinweisen, festgestellt werden. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 96 h. Repräsentative Abbildungen aus drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen. Die Aufnahmen wurden mit einem 20 x Objektiv angefertigt.

Die beobachteten morphologischen Veränderungen lieferten die Grundlage für eine detaillierte Zelltodanalyse der mit pro-inflammatorischen Zytokinen behandelten Myoblasten. Hierfür wurden durchflusszytometrische Untersuchungen mit dem

Farbstoff 7-Aminoactinomycin (7-AAD) durchgeführt. Dieser gilt als Zelltodmarker, da er nur in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen kann. Durch seine Fähigkeit zur Interkalation mit der DNA, wo er sich spezifisch zwischen Cytosin und Guanin anlagert und dadurch seine Fluoreszenzeigenschaften verändert, färbt er ausschließlich die DNA von nicht vitalen Zellen.

Hierbei zeigte sich bereits nach 48-stündiger Exposition der Myoblasten mit proinflammatorischen Zytokinen eine Verdopplung der stark granulären, 7-AAD positiven Population und nach 72 h war sogar eine 4- bis 6-fache Zunahme dieser Population zu verzeichnen (Anstieg von 0,7% auf 4,1% bei IL-1β mit IFN-γ) (Abb. 19 A)

Die Doppelfärbungen mit 7-AAD und DAF-2 unter identischen Bedingungen bestätigten die vermehrte NO-Produktion (hier mehr als 3-facher Anstieg), sowie die Zunahme an Zelltod unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Interessanterweise kam es zu einem bis zu 6-fachen Anstieg der doppelt positiven Population, wodurch ein direkter Zusammenhang zwischen Zelltod und vermehrter NO-Produktion, ausgelöst durch entzündlichen Zellstress, aufgezeigt werden konnte (Abb. 19 B).

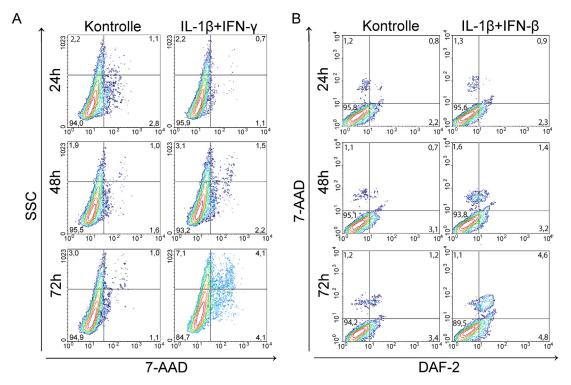


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse von Zelltod und NO-Produktion in humanen Myoblasten unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Myoblastenkulturen wurden für 24 h - 72 h mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml)) inkubiert. Repräsentative Konturblots aus drei Experimenten, die in A: die 7-AAD Färbungen gegen SSC aufgetragen und in B: die DAF-2 Färbungen gegen die 7-AAD Färbungen aufgetragen zeigen. A: Die Zelltodzunahme ist nach 72-stündiger Exposition mit IL-1 β und IFN- γ durch 5,8-fache Zunahme der SSC- und 7-AAD-positiven Population im oberen rechten Quadranten dargestellt. B: Der Zusammenhang zwischen Zelltod und Zytokin-bedingter NO-

Produktion ist durch die 5,1-fache Zunahme der 7-AAD- und DAF-2-positiven Population im oberen rechten Quadranten nach 72 h dargestellt.

Dies ließ sich darüber hinaus durch Inhibition der NO-Produktion mit dem iNOS-spezifischen Reagenz 1400W bestätigen. Hierfür wurde eine immunzytochemische Färbung mit Propidiumiodid durchgeführt. Dieses interkalliert ähnlich dem 7-AAD mit der DNA toter Zellen, da es durch deren geschädigte Zellmembran eindringen jedoch nicht mehr ausgeschleust werden kann. Die Färbung erbrachte ebenfalls eine signifikante (bis zu ***p<0,001) Zunahme toter Muskelzellen *in vitro* unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Durch Zugabe von 10 μM 1400W alle 24 h ließ sich deren Anzahl signifikant (bis zu ***p<0,001) reduzieren (Abb.20).

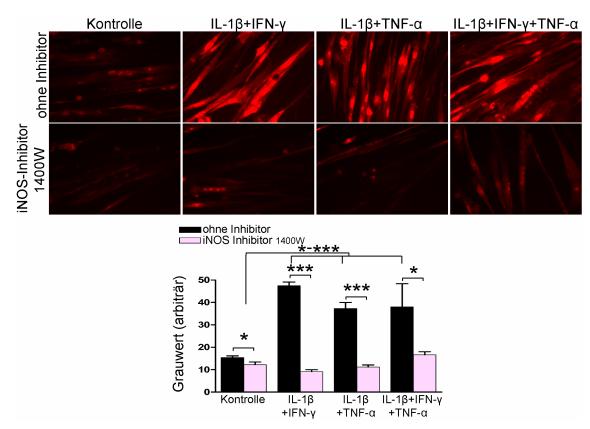


Abbildung 20: Zelltodfärbung nach Inhibition von iNOS in nicht-pathologischen Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Dargestellt ist die repräsentative Färbung mit Propidiumiodid an primären Myotubenkulturen nach 72-stündiger Inkubation mit IL-1 β (20 ng/ml), IFN- γ (300 U/ml) und TNF-a (10 ng/ml) in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des spezifischen iNOS Inhibitors 1400W; n=3 / Gruppe. Die quantitative Grauwertanalyse (unten) belegt sowohl die signifikante zytokinbedingte Zelltodinduktion, als auch deren Verhinderung durch iNOS-Inhibition (*p<0,05; ***p<0,001). Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

Zur genaueren Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus der Zelltodinduktion wurden die Myoblasten neben 7-AAD zusätzlich mit AnnexinV-APC

Ergebnisse 72

gefärbt. AnnexinV ist ein Protein, welches als Apoptosemarker spezifisch an Phosphatidylserin bindet. Dieses ist unter normalen Bedingungen an der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert und wird bereits im Frühstadium der Apoptose an die nach außen gerichteten Membranseite tranzloziert, da die Asymmetrie der Zellmembran verloren geht. Frühapoptotische Zellen sind bei diesem Verfahren nur AnnexinV positiv, während nekrotische und spätapoptotische Zellen doppelt positiv für AnnexinV und 7-AAD sind [Vermes et al. 1995].

Durch diese durchflusszytometrischen Untersuchungen konnten zunächst die Zytokinbedingte Zelltodzunahme der vorangegangenen Experimente (siehe oben) bestätigt werden, da nach 72 h 25% +/- 4,8% der Zellen 7-AAD positiv waren (3,2-fache Zunahme bei Inkubation mit IL-1β und IFN-γ). Darüber hinaus ergab die Analyse, dass nur ein kleiner Teil der Muskelzellen im inflammatorischen Milieu Zeichen einer frühen Apoptose aufweisen (ca. 2 bis 4 %), da die Doppelfärbung mit 7-AAD und AnnexinV-APC keine wesentliche Zytokin- und Zeit-abhängige Zunahme an AnnexinV positiven Myoblasten ergab (Abb 21).

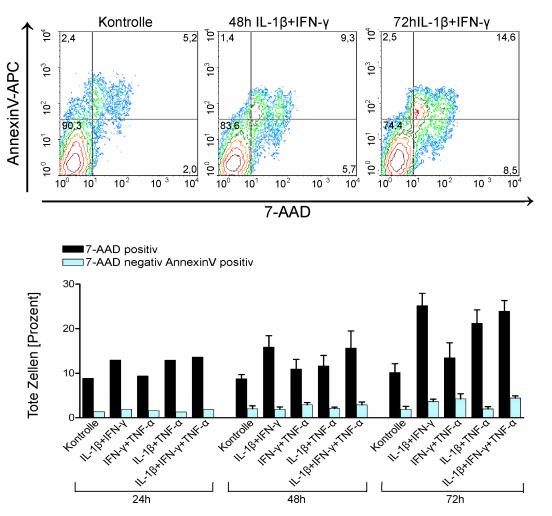


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Zelltodanalyse. Myoblastenkulturen wurden für 24 h - 72 h mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF-a (10 ng / ml) inkubiert; n=3 / Gruppe. oben: Konturblots der Färbung mit 7-AAD gegen

Ergebnisse 73

AnnexinV-APC zeigen 3-fachen Anstieg der 7-AAD-positiven Fraktion durch proinflammatorische Zytokine. unten: Quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse. Die schwarzen Balken entsprechen dem Prozentsatz an toten Zellen (7AAD-positiv), im Vergleich zu den in Apoptose gegangenen Zellen (7-AAD negativ, AnnexinV-APC positiv, hellblaue Balken) nach bis zu 72-stündiger Zytokinexposition.

Diese Ergebnisse, zusammen mit den morphologischen Beobachtungen, weisen bereits darauf hin, dass Apoptose nur eine untergeordnete Rolle beim durch entzündliche Zytokine induzierten Zelltods *in vitro* zugeschrieben werden kann. Um dies weiter zu untermauern, wurden zusätzlich Experimente zur Inhibierung des apoptotischen Zelltodweges durchgeführt. Caspasen, insbesondere die Caspasen 3, 6, 7 und 9, sind wesentlich an der Induktion von Apoptose beteiligt. Einerseits aktivieren sie sekundäre Zielproteine (z.B. Caspase aktivierte DNase, CAD, oder andere Caspasen), andererseits tragen sie direkt zum Abbau von Lamin (Bestandteil der Zellkernmembran) und Aktin (Teil des Zytoskeletts) bei.

Der generelle Caspaseinhibitor Q-VD-OPh (R&D SYSTEMS GmbH) [Cryns and Yuan 1998;Talanian et al. 1997] kann den apoptotischen Zelltod verhindern, während Staurosporin diesen in Myoblasten induziert [Weil et al. 1996]. Als Positivkontrolle für die erfolgreiche Inhibition dienten hier somit Myoblasten in denen mittels Staurosporin Apoptose in An- bzw. Abwesenheit des Caspaseinhibitors induziert wurde. Hierbei gingen nach 6-stündiger Inkubation der Myoblasten mit 1 µM Staurosporin 88,01% +/-7,52% der Zellen in Apoptose, wie die Doppelfärbung mit 7-AAD und AnnexinV-APC belegte. Wurden die Myoblasten dagegen zusätzlich mit 20 µM des generellen Caspaseinhibitors Q-VD-OPh inkubiert, war eine signifikante (**p<0,01) Reduktion der Apoptoserate auf 8,93% +/- 2,48% zu verzeichnen (Abb. 22 B). Betrachtete man dagegen die in analoger Weise mit Caspaseinhibitor und pro-inflammatorischen Zytokinen behandelten Myoblasten, war keine Reduktion des programmierten Zelltodes erkennbar. Wie in den zuvor beschriebenen Experimenten, kam es zu einer Zeit- und Zytokin-bedingten Zelltodinduktion, die sich nicht durch Caspaseinhibition verhindern ließ (Abb. 22 A). Auch hier wurde der Caspaseinhibitor alle 24 h frisch hinzugegeben, um über den gesamten Zeitraum von 72 h die Apoptose effektiv zu blocken.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass entzündlicher Zellstress nicht die Apoptoseinduktion bewirkt, sondern die Muskelzellen *in vitro* primär durch Nekrose sterben.

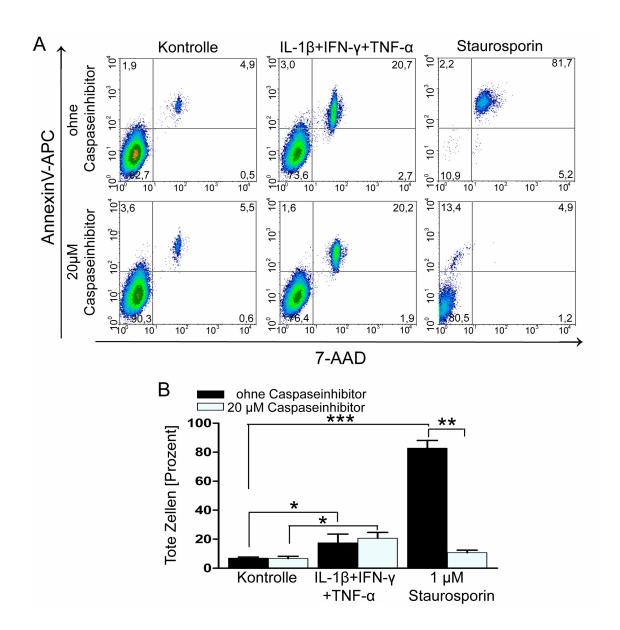


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Zelltodanalyse nach Caspaseinhibition. Myoblastenkulturen wurden für 72 h mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml) inkubiert in Anwesenheit bzw. Abwesenheit eines generellen Caspaseinhibitor (20 μ M). 6 h vor der durchflusszytometrischen Analyse wurde 1 μ M Staurosporin zu den entsprechenden Positvkontrollen geben; n=3 / Gruppe. A: Die *Density Blots* der Färbung mit 7-AAD gegen AnnexinV-APC zeigen einen 3-fachen Anstieg der doppelt-positiven Fraktion durch pro-inflammatorische Zytokine, sowie eine starke Apoptoseinduktion durch Staurosporin. B: Quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse. Die schwarzen Balken entsprechen dem Prozentsatz an toten Zellen ohne Caspaseinhibitor im Vergleich zu den mit 20 μ M Caspaseinhibitor behandelten Zellen (hellblau) nach 72 stündiger Zytokinexposition (**p<0,01).

4.3 Die Rolle von BACE1 für die Akkumulation von β-Amyloid unter entzündlichen Bedingungen

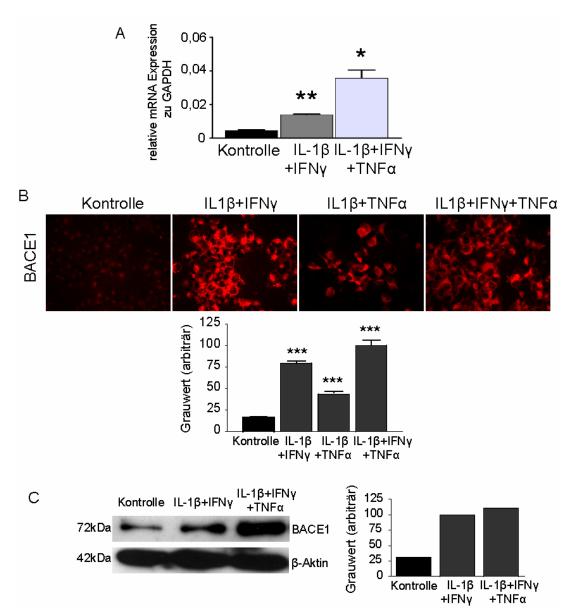
Im Folgenden wurde untersucht, in wiefern die Akkumulation von β-Amyloid im entzündlichen Milieu den auftretenden Zellstress weiter begünstigt oder sogar verstärkt. Dabei wurde gezielt die Funktion von BACE1 (*beta site of APP cleaving enzyme*1, vgl. Kapitel 1.2.2.1, Einleitung) analysiert, welche die wichtigste Sekretase bei der Prozessierung von APP in β-Amyloid darstellt (vgl. Abb. 4, Einleitung).

4.3.1 Expression von BACE1 unter entzündlichen Bedingungen

Wurden nicht-pathologische Myotubenkulturen oder Myoblasten mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1β, IFN-γ und TNF-α inkubiert, war bereits nach 36 h
ein signifikanter Anstieg in der mRNA Expression von BACE1 zu verzeichnen
(*p<0,05; **p<0,01) (Abb. 23 A). Nach Etablierung der immunzytochemischen Färbung
auf BACE1, sowie eines spezifischen Immunoblots, an mit dem BACE1-Plasmid
pBlueBace1 transfizierten Myoblasten (Daten nicht abgebildet), erfolgte der
experimentelle Nachweis der BACE1 Proteinexpression. Hierbei konnte nach
prolongierter Zytokinexposition von bis zu 72 h eine hoch signifikante Überexpression
von BACE1 (***p<0,001), vor allem im Membranbereich der Zellen detektiert werden
(Abb. 23 B). Die angefertigten Immunoblots zeigten bereits unter basalen Bedingungen
eine 72 kDa große Bande, welche die reife, vollständig glykolysierte Form von BACE1
darstellt. Deren Intensität nahm im pro-inflammatorischen Milieu deutlich zu (Abb.
23 C).

Diese entzündungsbedingte vermehrte Bildung von BACE1 kann die unter Punkt 4.1.3 beschriebene Akkumulation und Aggregation von β -Amyloid begünstigen, da es nur über den β -Sekretaseweg zur β -Amyloidgenerierung kommt (vgl. Abb 4 der Einleitung).

Ergebnisse 76



Nachweis Abbildung 23: **BACE1-Induktion** in der vitro unter inflammatorischen Bedingungen. Exposition nicht-pathologischen von Myotubenkulturen und Myoblasten mit Kombinationen von IL-1β (20 ng / ml), IFN-γ (300 U / ml) und TNF-a (10 ng / ml); n=3 / Gruppe. A: Analyse der mRNA-Expression von BACE1 in Relation zu GAPDH nach 36 h (*p<0,05; **p<0,01). B: repräsentative immunzytochemische Färbungen auf BACE1 nach 72 h, sowie Grauwertanalyse der Färbungen nach 40 h und 72 h (***p<0,001). C: der Immunoblot (links) zeigt die Zytokin-bedingte Zunahme von BACE1 nach 72 h sowie dessen quantitative Grauwertananlyse (rechts). Die Aufnahmen in B wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.3.2 siRNA vermittelter knock-down von BACE1

Über einen auf siRNA-basierenden *knock-down* von BACE1 wurde als nächstes der Frage nachgegangen, in wie weit BACE1 in dem hier dargestellten *in vitro* System an der Prozessierung von APP zu β-Amyloid beteiligt ist und so die zuvor in Kapitel 4.1

beschriebene Zelldegeneration und –entzündung fördert bzw. in den im Kapitel 4.2.5 beschriebenen Zellstress und Zelltod involviert ist.

4.3.2.1 Transfektion von Myoblasten und Myotuben mit siGLO

Da ausdifferenzierte primäre Myotubenkulturen zu den schwer transfiziebaren Zellen gehören, wurde in Vorexperimenten mit einer doppelsträngigen, fluoreszenzmarkierten siRNA (siGLO-*Green* siRNA, 6-FAM-markiert) die Transfektionrate getestet. Die Methode wurde unter zur Hilfenahme eines auf Nanopartikeln basierenden Transfektionsreagenzes (Nanofektin siRNA) durchgeführt. Die fluoreszente siRNA sollte nach gelungener Transfektion intrazellulär nachweisbar sein. Bereits nach 24 h konnte in der fluoreszensmikroskopischen Analyse sowohl in Myoblasten- als auch in Myotubenkulturen die siGLO-*Green* siRNA detektiert werden. Falsch positive Ergebnisse wurden durch mehrmaliges Waschen der Kulturen reduziert, wobei nicht in die Zellen eingedrungene siGLO-*Green* siRNA entfernt wurde (Abb. 24).

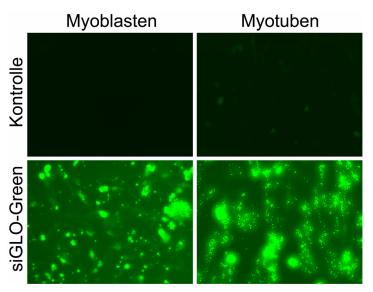


Abbildung 24: Transfektion von Myoblasten und Myotuben mit siGLO-Green siRNA in vitro. Repräsentative Aufnahmen von Myoblasten und primäre Myotuben-kulturen 24 h nach Transfektion mit der 6-FAM-fluoreszenzmarkierten siRNA siGLO-Green; n=3. Die Aufnahmen wurden mit einem 20 x Objektiv angefertigt.

Im Anschluss an diese Vorexperimente, die die prinzipielle Transfizierbarkeit von primären Myotubenkulturen belegten, erfolgte die Etablierung der eigentlichen knockdown Experimente mit einer BACE1 spezifischen siRNA.

Ergebnisse 78

4.3.2.2 Analyse der BACE1 knock-down Effizienz

Zunächst wurde die optimale Konzentration der BACE1-Silencer® Validated siRNA (BACE1-siRNA) in unserem Zellkultursystem ermittelt. Unter Berücksichtigung der höchstmöglichen knock-down Effizienz sowie geringstmöglichen Zytotoxizität lag diese bei 100 mM und das optimale Verhältnis von siRNA zu dem Transfektionsreagenz Nanofektin-siRNA bei 1:2,5. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit einer Silencer® Negative Control siRNA (Kontroll-siRNA) behandelt, die in humanen Zellen keine Modulation von mRNA induziert. Darüber hinaus wurde die mRNA Expression in nur mit den Transfektionsreagenz Nanofektin behandelten, sowie in unbehandelten Zellen bestimmt. Über diese Kontrollen sollten unspezifische siRNA-vermittelte oder transfektionsbedingte Effekte untersucht werden.

Die Verwendung der BACE1-spezifischen siRNA führte bereits nach 48 h in den Myoblastenkulturen zu einer 87,3% +/- 0,87% und in primären Myotubenkulturen zu einer bis zu 96,5% +/- 0,58% Reduktion der Expression der BACE1 mRNA, verglichen mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen (***p<0,001 bzw. **p<0,01) (Abb. 25).

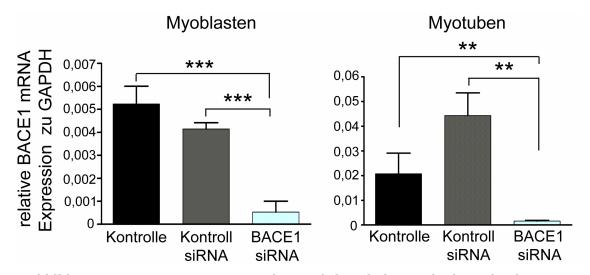


Abbildung 25: BACE1 mRNA Expression nach *knock down* **mit siRNA** *in vitro*. Die Transfektion von Myoblasten und nicht-pathologischen Myotubenkulturen mit BACE1-siRNA resultiert in einer signifikanten Reduktion der BACE1 Expression relativ zu GAPDH nach 48 h im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA tranfizierten und unbehandelten Zellen; n=3 / Gruppe; **p<0,01; ***p<0,001.

Auch im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Kontrollen) konnte eine signifikant verminderte BACE1 mRNA Expression ermittelt werden. Allerdings zeigten sich Transfektions-bedingte Effekte die sich in Myoblasten und Myotuben unterschiedlich stark ausprägten und zwischen den Experimenten schwankten. Die *knock-down* Effizienz und auf dem *knock-down* basierende Effekte wurden daher im Folgenden

immer im Vergleich zur Kontroll-siRNA beleuchtet, die nicht-transfizierten Kontrollen der entsprechenden Gruppen aber immer mitgeführt.

Darüber hinaus wurden die mit siRNA transfizierten Muskelzellkulturen mit unterschiedlichen Kombinationen der Zytokinen IL-1β, IFN-γ und TNF-α inkubiert. Die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen zeigten dabei nach 72 h einen signifikanten Anstieg der BACE1 mRNA Expression unter pro-inflammatorischen Bedingungen (Myoblasten: *p<0,05; Myotuben:**p<0,01). Im Gegensatz dazu war diese nach *knockdown* mit BACE1-siRNA in den Myoblasten um bis zu 72 % bzw. in den Myotuben um bis zu 94 % reduziert (Abb. 26). Somit konnte nicht nur unter Kontrollbedingungen sondern auch im pro-inflammatorischen Milieu die Hochregulation der BACE1 mRNA signifikant vermindert werden (in Myoblasten bis zu **p<0,01 bzw. in Myotuben bis zu ***p<0,001) (Abb. 26).

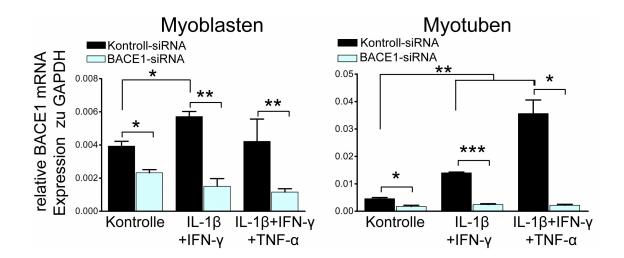


Abbildung 26: BACE1 mRNA Expression nach *knock down in vitro* unter proinflammatorischen Bedingungen. Die Transfektion von Myoblasten und nichtpathologische Myotubenkulturen mit BACE1-siRNA resultiert in einer signifikanten Reduktion der BACE1 mRNA Expression relativ zu GAPDH nach 72 h im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen auch nach Exposition mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml); n=3 / Gruppe; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Da der spezifische *knock-down* nachweisbar war, konnte auf eine zusätzliche Positivkontrolle (zB. GAPDH-siRNA) verzichtet werden.

Auch in der komplementär durchgeführten immunzytochemischen Untersuchung zeigte sich eine signifikante, durch pro-inflammatorische Zytokine bedingte Proteinüberexpression von BACE1 in den mit Kontroll-siRNA behandelten Myoblasten und Myotuben nach 72 h (***p<0,001). Diese wurde nach *knock-down* von BACE1 sowohl in unbehandelten, als auch in zytokinexponierten Zellen deutlich reduziert

(**p<0,01 bis ***p<0,001) (Abb. 27 A). Diese Daten ließen sich durch einen in analoger Weise durchgeführten BACE1-Immunoblot bestätigen (Abb. 27B).

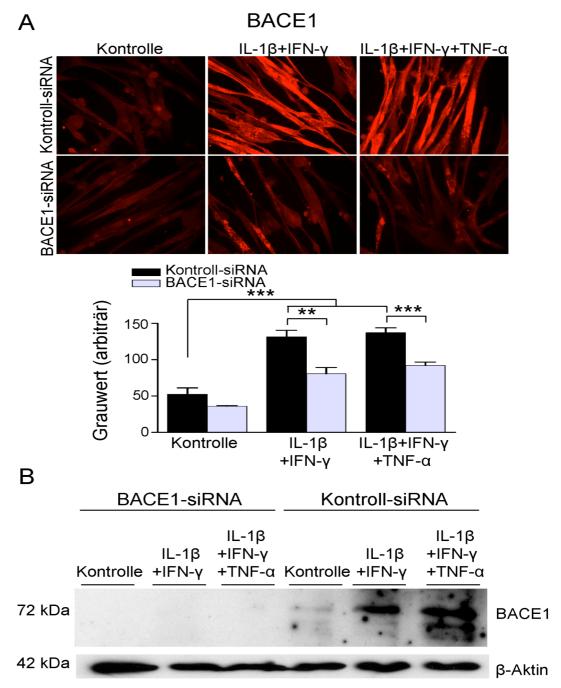


Abbildung 27: Expression von BACE1 nach *knock down* in nicht-pathologischen Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Exposition von nicht-pathologischen Myotuben mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml) in Anwesenheit von BACE1-siRNA bzw. KontrollsiRNA; n=3 / Gruppe. A: Repräsentative immunzytochemische Färbungen auf BACE 1 nach 72 h (oben). Die quantitative Grauwertanalyse der Färbungen nach 40 h und 72 h belegt statistisch signifikante Reduktion der BACE1 Expression nach BACE1 *knock-down* (hellgraue Säulen) gegenüber dem Kontroll *knock-down* (schwarze Säulen) (**p<0,01; ***p<0,001). B:Der Immunoblot zum Proteinnachweis von BACE1 nach 72 h belegt die immunzytochemisch erhobenen BACE1 *knock-down* Daten Die gleichbleibende

Proteinmengen wurden durch β -Aktin bestätigt. Die Aufnahmen in A wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.3.2.3 Analyse der APP-Prozessierung nach BACE1 knock-down

Nach *knock-down* von BACE1 blieb die Genexpression von APP in Myoblastenkulturen sowie in Kulturen primärer Myotuben unverändert (nicht gezeigt).

Allerdings zeigte sich sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch nach Exposition mit pro-inflammatorischen Zytokinen eine signifikante Verminderung der Akkumulation von β-Amyloid, sowie eine reduzierte Aggregatbildung in der ThioflavinS-Färbung, da sich die Signalintensitäten halbierten (Abb. 28 A). Im Gegensatz dazu war die Akkumulation von β-Amyloid sowie dessen Aggregation in den mit Kontroll-siRNA behandelten Myotuben unter entzündlichen Bedingungen signifikant gesteigert (Abb. 28 A).

Der Immunoblot bewies darüber hinaus eine Zunahme an unprozessiertem APP, welches bei der durch *knock-down* von BACE1 reduzierten β-Sekretaseaktivität zu erwarten war (Abb. 28 B)

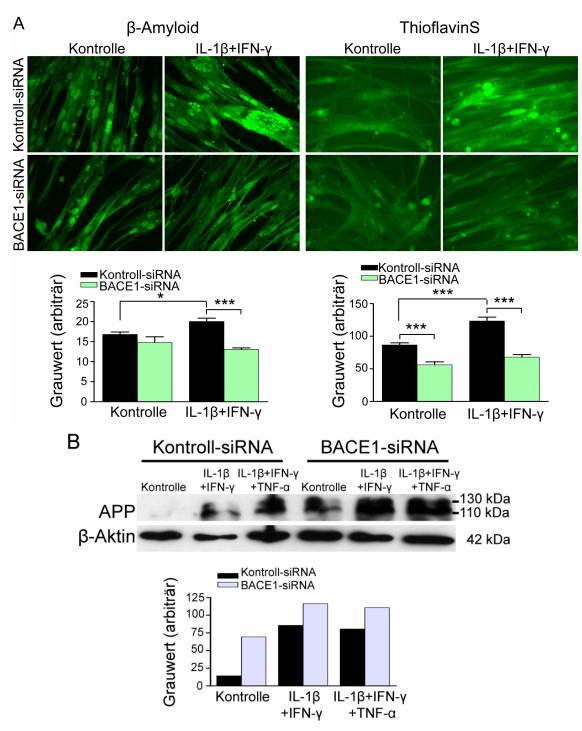


Abbildung 28: Analyse der APP-Prozessierung nach *knock-down* von BACE1 in nicht-pathologischen Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Exposition von nicht-pathologischen Myotuben mit Kombinationen von IL-1β (20 ng / ml), IFN-γ (300 U / ml) und TNF-α (10 ng / ml) in Anwesenheit von BACE1-siRNA bzw. Kontroll-siRNA für 72 h; n=3 / Gruppe A: Repräsentative immunzytochemische und zytochemische Färbungen auf β-Amyloid-Akkumulationen mit 6E10 (links) und β-Amyloid-Aggregate mit ThioflavinS (rechts), sowie die quantitativen Grauwertanalysen der Färbungen nach 40 h und 72 h belegt statistischde Signifikanz (*p<0,05; ***p<0,001). B: Der Immunoblot zeigt sowohl zytokinbedingte APP-Überexpression sowie zusätzlich verstärkte Akkumulation von APP (110-130 kDa) durch Ausbleiben der Prozessierung nach BACE1 *knock-down*. Als Ladekontrolle wurde der β-

Aktin-Nachweis (42 kDa) verwendet. Unten: quantitativen Grauwertanalyse des Immunoblots. Die Aufnahmen in A wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.3.2.4 <u>Analyse der Expression von entzündlichen und degenerativen Markern nach</u> BACE1 knock down

Im Folgenden wurde die Auswirkung des BACE1 knock-down auf weitere Degenerations- und Entzündungs-assoziierte Marker analysiert.

Die mRNA Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β und die der mit pro-inflammatorischen Zellstress in Verbindung stehenden induzierbare Stickoxidsynthetase (iNOS) waren nach 48 stündiger Exposition mit entzündlichen Zytokinen signifikant erhöht. Diese Induktion wurde durch den *knock-down* von BACE1 unterbunden (IL-1 β p=0,074; iNOS **p<0,01) (Abb. 29). Dagegen blieb die Überexpression von MHC-I und CXCL-9 unverändert und es zeigte sich ebenfalls keine Änderung in der mRNA Expression von α B-Crystallin (Abb. 29).

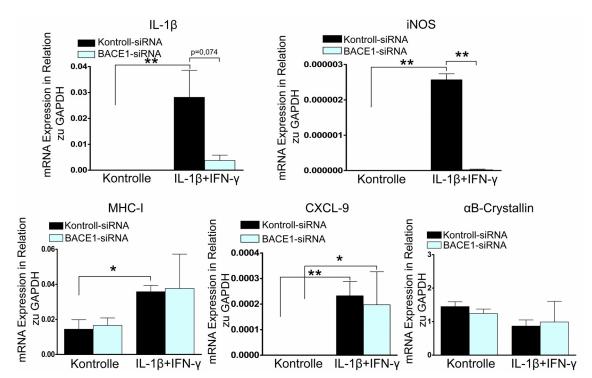


Abbildung 29: *in vitro* mRNA Expression Entzündungs- und Zellstress-assoziierter Markern nach BACE1 *knock-down*. Exposition von nicht-pathologischen Myotuben mit IL-1 β (20 ng / ml) und IFN- γ (300 U / ml) nach Behandlung mit BACE1-siRNA bzw. Kontroll-siRNA; n=3 / Gruppe. Dargestellt ist die Analyse der mRNA Expression von IL-1 β , iNOS, MHC-I, CXCL9 und α B-Crystallin relativ zu GAPDH nach 48 h, wobei die mit BACE1-siRNA behandelte Zellen (hellblaue Säulen) denen mit Kontroll-siRNA behandelten (schwarze Säulen) gegenübergestellt sind; *p<0,05; **p<0,01.

Neben Veränderungen in der mRNA Expression wurde in immunzytochemischen Färbungen die Auswirkung des BACE1 *knock-down* auf die Proteinexpression von sIBM-relevanten Entzündungs-assoziierten Markern nach 72 h untersucht. Hierbei konnte in den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen die bekannte signifikante Induktion der IL-1β Expression durch pro-inflammatorische Zytokine bestätigt werden. Dagegen zeigte sich sowohl basal (Kontrolle) als auch unter entzündlichen Bedingungen eine signifikante Verminderung der IL-1β Expression als Folge des *knock-down* von BACE1 (Abb. 30 A). Hier war das IL-1β Signal im entzündlichen Milieu dreifach reduziert verglichen zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Ähnliches konnte auch für das Chemokin CXCL-9 festgestellt werden, wobei das immunzytochemische Signal durch den BACE1 *knock-down* um die Hälfte vermindert wurde.

Die Expression des MHC-I Komplexes war unter Kontrollbedingungen insgesamt sehr gering (Abb. 30 C). Ähnlich wie für IL-1β und CXCL-9 konnte die Hochregulation des MHC-I im inflammatorischen Milieu durch die BACE1-siRNA blockiert werden (Abb. 30 C).

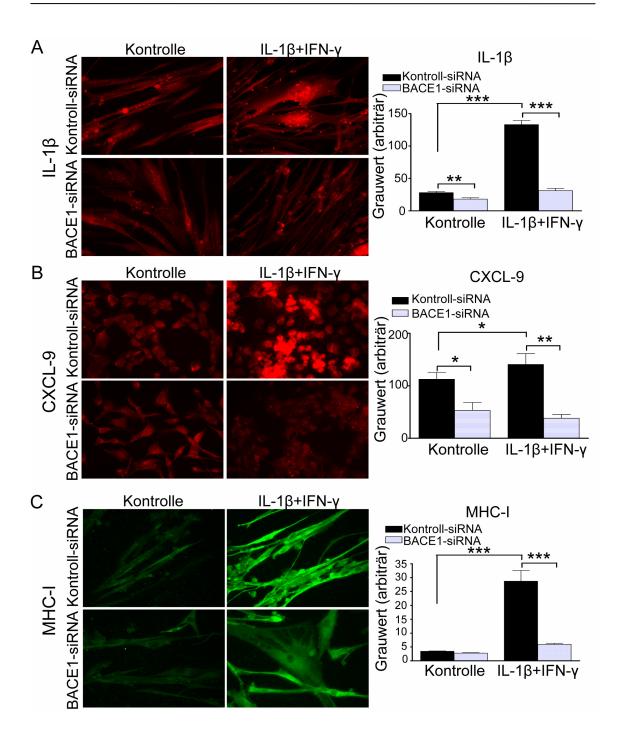


Abbildung 30: Immunzytochemische Analyse der Expression von IL-1 β , CXCL-9 und MHC-I nach BACE1 knock-down unter pro-inflammatorischen Bedingungen in vitro. Exposition von nicht-pathologischen Myotuben und Myoblasten mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml) und IFN- γ (300 U / ml) für 72 h nach 6-stündiger Behandlung mit BACE1-siRNA bzw. Kontroll-siRNA; n=3 / Gruppe. Links: Repräsentative immunzytochemische Färbungen auf A: IL-1 β , B: CXCL-9 und C: MHC-I. In A und C sind nicht-pathologische Myotuben und in B Myoblasten abgebildet. Rechts: Die quantitativen Grauwertanalysen der Färbungen belegen die statistisch signifikante Reduktion der Expression nach BACE1 knock-down (hellgraue Säulen) gegenüber der knock-down Kontrolle (schwarze Säulen) (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

Die Analyse von Degenerations- und Zellstress-assoziierten Molekülen, wie phosphoryliertes Tau / Neurofilament und dem Hitze-Schock-Protein αB-Crystallin ergab ein ähnliches Bild. Entzündliche Stimuli resultierten auch hier bei den mit Kontroll-siRNA transfizierten Myotubenkulturen in einem signifikanten Anstieg der Proteinexpression (Abb. 31), welcher durch den *knock-down* von BACE1 unterdrückt werden konnte. Darüber hinaus war bereits die basale Proteinexpression von phosphoryliertem Tau / Neurofilament und αB-Crystallin durch die BACE1-siRNA Behandlung der Zellen signifikant reduziert und blieb unter pro-inflammatorischen Bedingungen auf dem gleichen Level (Abb. 31).

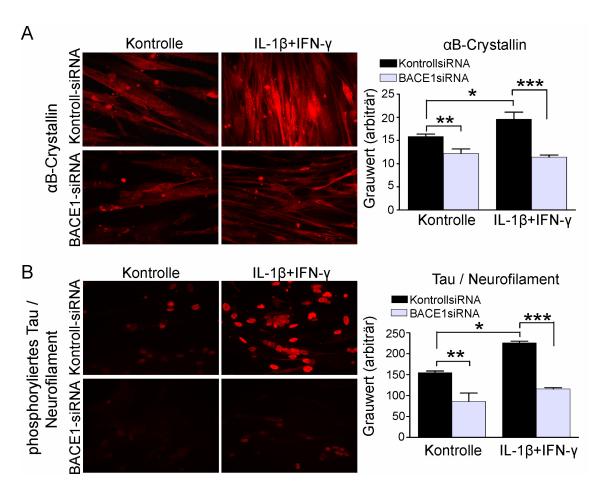


Abbildung 31: Immunzytochemische Analyse der Expression von aB-Crystallin und phosphoryliertem Tau / Neurofilammetn nach BACE1 knock-down unter pro-inflammatorischen Bedingungen in vitro. Exposition von nicht-pathologischen Myotubenkulturen mit Kombinationen von IL-1β (20 ng / ml) und IFN-γ (300 U / ml) für BACE1-siRNA Kontroll-siRNA; nach 6-stündiger Behandlung mit bzw. n=3 / Gruppe. Links: Repräsentative immunzytochemische Färbungen aB-Crystallin und B: phosphoryliertes Tau / Neurofilament. Rechts: Die quantitativen Grauwertanalysen der Färbungen belegen die statistisch signifikante Reduktion Expression nach BACE1 knock-down (hellgraue Säulen) gegenüber der knock-down Kontrolle (schwarze Säulen) (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

Auch die durch entzündlichen Zellstress hervorgerufene Induktion von iNOS blieb nach dem *knock-down* von BACE1 im Vergleich zur Kontrolltransfektion aus (Abb. 32). Die iNOS-Proteinexpression war hoch signifikant verringert (***p<0,001) gegenüber den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen und lag auf dem gleichen Niveau wie in Zellen, die keinen entzündlichen Reizen ausgesetzt waren. Dies ging mit einer geringeren NO-Produktion einher, wie die Färbung auf nitrierte Tyrosinreste zeigte (Abb. 32).

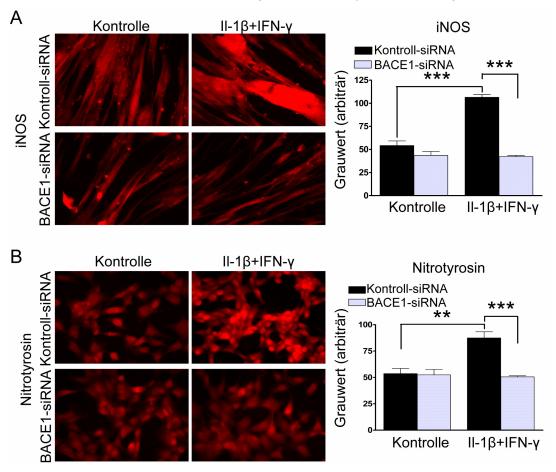


Abbildung 32: Immunzytochemische Analyse von NO-assoziiertem Zellstress nach knock-down von BACE1 unter pro-inflammatorischen Bedingungen in vitro. Exposition von nicht-pathologischen Myotuben und Myoblasten Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml) und IFN- γ (300 U / ml) für 72 h nach 6-stündiger Behandlung mit BACE1-siRNA bzw. Kontroll-siRNA; n=3 / Gruppe. Links: Repräsentative immunzytochemische Färbungen auf A: iNOS (Myotuben) und B: Nitrotyrosin (Myoblasten). Rechts: Die quantitativen Grauwertanalysen der Färbungen belegen die statistisch signifikante Reduktion der iNOS Expression sowie der Nitrierung von Tyrosin nach BACE1 knock-down (hellgraue Säulen) gegenüber der knock-down Kontrolle (schwarze Säulen) (**p<0,01; ***p<0,001). Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.3.2.5 <u>Zelltodanalyse nach BACE1 knock-down unter pro-inflammatorischen</u> Bedingungen

Nach BACE1 knock-down und der dadurch verringerten β -Amyloid-Akkumulation hatte sich eine Verringerung der Expression weiterer degenerativer und entzündlicher Mediatoren gezeigt. Darüber hinaus konnte eine Reduktion von Zellstress-assoziierten Molekülen wie NO und α B-Crystallin demonstriert werden (s.o.).

Um mögliche Effekte des BACE1 *knock-down* auf die Zelltodinduktion zu untersuchen, wurde diese zytochemisch mittels Propitiumiodid (PI) unter pro-inflammatorischen Bedingungen sowie nach BACE1 *knock-down* analysiert. Die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen starben nach 72-stündiger Exposition mit IL-1β und IFN-γ signifikant häufiger (***p<0,001), als die Zellen in denen die BACE1 Expression unterdrückt wurde. Darüber hinaus führte der siRNA vermittelte *knock-down* von BACE1 bereits in den nativen Zellen zu einem um die Hälfte reduziertem PI-Signal im Vergleich zur Kontrolltransfektion. Interessanterweise blieb der durch entzündliche Zytokine induzierte Zelltod nach Behandlung mit BACE1-siRNA nahezu vollständig aus (Abb. 33).

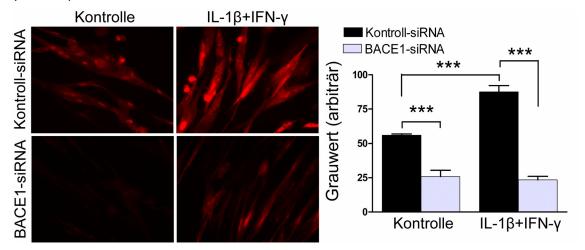


Abbildung 33: Zytochemische Analyse des Zelltodes nach *knock-down* von BACE1 unter pro-inflammatorischen Bedingungen *in vitro*. Exposition von nichtpathologischen Myotubenkulturen mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml) und IFN- γ (300 U / ml) für 72 h nach 6-stündiger Behandlung mit BACE1-siRNA bzw. KontrollsiRNA; n=3 / Gruppe. Links: Repräsentative zytochemische Färbungen auf Zelltod mit PI. Rechts: Die quantitativen Grauwertanalysen der Färbungen belegen die statistisch signifikante Reduktion der PI positiven Myotuben nach BACE1 *knock-down* (hellgraue Säulen) gegenüber der *knock-down* Kontrolle (schwarze Säulen) (***p<0,001). Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.3.3 pharmakologische Inhibition von BACE1

Zur Bestätigung der unter 4.3.2. erzielten Ergebnisse wurden die Myoblasten und Myotuben alternativ mit einem zellpermeablen BACE1-Inhibitor (β -Secretase Inhibitor IV) behandelt, welcher an das aktive Zentrum von BACE1 bindet und gezielt dessen proteolytische Aktivität blockiert. In Vorexperimenten wurde dieser BACE1-Inhibitor titriert, um seine optimale Konzentration in dem vorliegenden *in vitro* Modell zu ermitteln. Hierbei wurden Konzentrationen von 10 nM – 5000 nM getestet, wobei sich bereits mit 500 nM die gewünschten Effekte einer verminderten BACE1-Aktivität zeigten. Dies konnte durch die Reduktion der β -Amyloid-Akkumulation unter proinflammatorischen Bedingungen belegt werden (Abb. 34). Da es sich bei dem Hemmstoff um ein relativ instabiles Reagenz handelt, musste er alle 24 h erneut zu den Zellen hinzu gegeben werden.

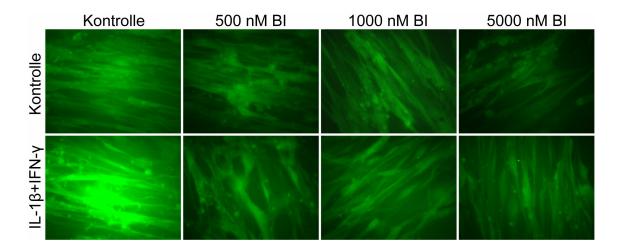


Abbildung 34: Titrierung des BACE1-Inhibitors. Exposition von nichtpathologischen Myotuben mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml) und IFN- γ (300 U / ml) für 72 h in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des BACE1-Inhibitors (BI) in unterschiedlichen Konzentrationen (500 nM – 5000 nM). Repräsentative zytochemische Färbungen aus 3 Experimenten bei denen β -Amyloidaggregate mit ThioflavinS angefärbt wurden. Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.3.3.1 Analyse der APP-Prozessierung nach BACE1-Inhibition

Nach 72-stündiger Inkubation der Myoblasten und Myotubenkulturen mit dem BACE1-Inhibitor kam es sowohl in unstimulierten Zellen, als auch unter pro-inflammatorischen Konditionen zu einer signifikanten (bis ***p<0,001) Verminderung der Akkumulation und Aggregatbildung von β-Amyloid, was mittels ThioflavinS-Färbung gezeigt werden konnte. Analog zum BACE1 *knock-down* (vgl. Abb.28 B), ließ sich im Immunoblot eine

verstärkte Anreicherung von APP in den mit BACE1-Inhibitor behandelten Zellen nachweisen (Daten nicht abgebildet).

4.3.3.2 <u>Analyse der Expression von entzündlichen und degenerativen Markern nach</u> <u>BACE1-Inhibition</u>

Die Myoblasten und Myotubenkulturen wurden über einen Zeitraum von 72 h mit proinflammatorischen Zytokinen in An- bzw. Abwesenheit des BACE1-Inhibitors behandelt. Hierbei zeigte sich, analog zu Kapitel 4.1, die entzündungsbedingte Hochregulation von IL-1β, CXCL-9 und MHC-I. Interessanterweise war diese in Anwesenheit des BACE1-Inhibitors signifikant reduziert (für IL-1β: *p<0,05; für CXCL-9: ***p<0,001; für MHC-I: ***p<0,001).

Ähnliches zeigte sich in der Proteinexpression von αB-Crystallin. Auch dessen Überexpression im entzündlichen Milieu konnte durch die BACE1 Blockade signifikant unterbunden werden (***p<0,001).

Darüber hinaus war die Zytokin-bedingte NO-Produktion, analog zum BACE1 *knockdown*, in Anwesenheit des BACE1-Inhibitors signifikant vermindert (***p<0,001), wie die Färbung auf nitrierte Tyrosinreste belegte (Daten nicht abgebildet).

4.3.3.3 <u>Zelltodanalyse nach BACE1-Inhibition unter pro-inflammatorischen</u> <u>Bedingungen</u>

Analog zum BACE1 *knock-down* wurden auch mögliche Effekte der BACE1 Inhibition auf die Zelltodinduktion im entzündlichen Milieu analysiert. Dies erfolgte ebenfalls zytochemisch mittels PI, nachdem die Zellen 72 h mit pro-inflammatorischen Zytokinen in An- bzw. Abwesenheit des BACE1-Inhibitors behandelt wurden. Auch hier kam es, übereinstimmend mit den unter 4.3.2.5 aufgeführten Ergebnissen, durch die Hemmung der β-Sekretase-Aktivität zu einem signifikant verminderten Zelltod unter entzündlichen Bedingungen (Daten nicht abgebildet).

4.4 Einfluss der Überexpression von APP auf entzündlichen und degenerativen Zellstress

In den vorangegangenen Experimenten wurde der Einfluss von entzündlichem Zellstress auf degenerative und entzündliche Reaktionen *in vitro* untersucht. Die Überexpression von APP in primären Myotubenkulturen von nicht-pathologischen Kontrollen soll in diesem Projektteil als *in vitro* Modell für degenerativen Zellstress dienen. Die Fragestellung ist nun also genau gegenläufig, nämlich in wiefern eine

β-Amyloid-assoziierte Degeneration entzündlichen Zellstress induzieren bzw. verstärken kann.

Darüber hinaus sollte unter Bedingungen von APP Überexpression sowie nach Exposition zu pro-inflammatorischen Zytokinen in Myotubenkulturen die Expression der in der sIBM hochregulierten Mediatoren analysiert werden.

Als Modell für degenerative intrazelluläre Mechanismen wurde die adenovirale APP Überexpression in den primären Myotubenkulturen gewählt, wobei der pAd-APP Vektor der Expression der APP₆₉₅-Form diente und pAd-GFP als GFP-exprimierender Kontrollvektor fungierte. Dieses auf dem pAdEasy-System [He *et al.* 1998] basierende Modell ist unter Kapitel 3.3.6 des Methodenteils genauer beschrieben.

Die Analyse der mit pAd-APP infizierten nicht-pathologischen Myotubenkulturen ergab bereits nach 24 h eine hoch signifikante (***p<0,001) APP-mRNA Überexpression im Vergleich zu den mit pAd-GFP infizierten Zellen. In einer Langzeitinfektions-untersuchung ließ sich diese signifikante Überexpression auch noch nach bis zu 96 h nachweisen (Abb. 35)

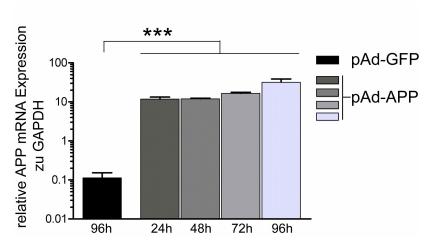


Abbildung 35: APP-mRNA Expression in adenoviral infizierten Myotuben. Analyse der mRNA Expression von APP relativ zu GAPDH 24 h bis 96 h nach Infektion von nicht-pathologische Myotubenkulturen mit 1.2×10^7 pfu / μ l pAd-APP bzw. pAd-GFP pro Well (24-Well Platte). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD; n=3 / Gruppe; ***p<0,001.

Die APP-Proteinexpression wurde zunächst nach 72-stündiger Infektion mit pAd-APP bzw. pAd-GFP im Immunoblot bestimmt. Hierbei zeigte sich in den mit pAd-APP infizierten nicht-pathologischen Myotubenkulturen eine deutliche Überexpression des gesamt APP im Vergleich zu den Kontrollinfektionen. Darüber hinaus konnte durch Ko-Inkubation mit einem polyklonalen Kaninchen anti-APP und einem polyklonalen

Kaninchen anti-GFP Antikörper gezeigt werden, dass es nur in den pAd-GFP infizierten Myotuben zu einer GFP-Überexpression kommt. Dies ist auf das Fehlen des GFP-Gens im adenoviralen APP-Vektor zurückzuführen (Abb. 36 A). Nicht nur die reife, vollständig glykosylierte Form von APP wird in den pAd-APP infizierten Myotubenkulturen vermehrt gebildet, es kommt auch zu einer gesteigerten Bildung der Spaltprodukte im Vergleich zu Kontrollinfektionen (pAd-GFP) (Abb. 36 B). Die Detektion erfolgte mit dem monoklonalen 6E10 Antikörper, der gegen ein Epitop in der Aminosäuresequenz 1-17 der β -Amyloidsequenz gerichtet ist. Daher kann es sich bei den Spaltprodukten z.B. um β -CTF (C99) und Oligomere des β -Amyloids handeln (vgl. Abb.4 der Einleitung).

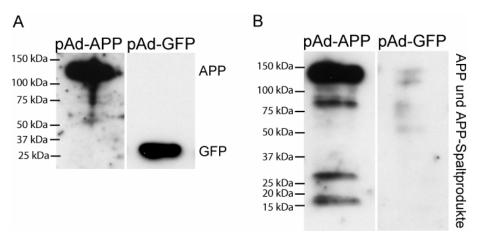


Abbildung 36: Analyse der APP- und GFP- Expression in adenoviral infizierten Myotuben in vitro. Westernblotanalyse nach 72 h Infektion von nicht-pathologischen Myotuben mit 1.2×10^8 pfu / μ l pAd-APP bzw. pAd-GFP pro Well (6-Well Platte). Repräsentative Abbildungen aus drei Experimenten. A: Analyse der APP und GFP Expression mit anti-APP und anti-GFP. B: Vermehrte APP Prozessierung nach Infektion mit pAd-APP im Vergleich zu pAd-GFP über anti- β -Amyloid / APP (6E10) im Immunoblot detektiert.

Nicht nur im Immunoblot, sondern auch in der immunzytochemischen Färbung zeigte sich 72 h nach Infektion mit pAd-APP eine deutliche APP-Überexpression, wohingegen in den pAd-GFP-infizierten Zellen lediglich eine basale APP Expression ähnlich der in uninfizierten Zellen zu verzeichnen war (Abb. 37 A). Die erfolgreiche Infektion konnte mittels der GFP Expression belegt werden. Darüber hinaus kam es zu einer signifikanten (***p<0,001) β -Amyloid-Akkumulation in den pAd-APP infizierten Myotuben. Eine zusätzliche Behandlung der infizierten Myotuben mit IL-1 β und IFN- γ über 72 h führte in den Kontrollen (pAd-GFP Infektion) wie erwartet zu einer signifikanten Akkumulation von β -Amyloid (**p<0,01). In den APP überexprimierenden Myotuben konnte die β -Amyloid-Akkumulation jedoch nicht weiter durch proinflammatorische Zytokine gesteigert werden. Allerdings lag sie bereits ohne

Ergebnisse 93

entzündlichen Stimulus höher, als in den Zytokin-behandelten, nicht APP-infizierten Zellen (Abb. 37 B).

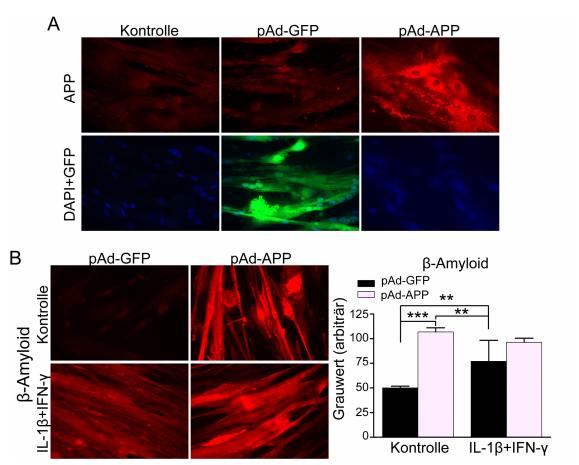


Abbildung 37: Expression von APP und β-Amyloid in Myotuben nach adenoviraler Infektion *in vitro*. Immunzytochemische Analyse nach Infektion nichtpathologischer Myotubenkulturen mit 6.0×10^6 pfu / μl pAd-APP bzw. pAd-GFP pro Kammer (8-Kammerobjektträger); n=3 / Gruppe. A: Repräsentative immunzytochemische Färbungen auf APP und Zellkerne (DAPI) nach 72 h. GFP Signal im Overly mit DAPI nur nach pAd-GFP-Infektion nachweisbar. B: Immunzytochemische Färbungen auf β-Amyloid-Akkumulationen mit 6E10, wobei 24 h nach Infektion die Inkubation mit $1L-1\beta$ (20 ng / ml) und $1EN-\gamma$ (300 U / ml) für 72 h erfolgte. Rechts: Quantitative Grauwertanalyse der Färbungen (**p<0,01; ***p<0,001). Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.4.1 Analyse der Expression von Degenerations- und Entzündungsassoziierten Markern mittels RT-PCR

Primäre nicht-pathologische Myotubenkulturen wurden mit pAd-APP bzw. pAd-GFP infiziert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Kombinationen pro-inflammatorischer Zytokine im Vergleich zu unbehandelten Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte. Die

Myotuben wurden dabei 24 h und 48 h nach Infektion für 48 h und 72 h mit Zytokinen behandelt. Durch die Wahl dieser unterschiedlichen Zeitpunkte wurde die Modulation der mRNA-Expression im Zeitverlauf erfasst. Zunächst erfolgte die Analyse der sIBM-relevanten entzündlichen und degenerativen Marker IL-1β, CXCL-9, APP und αB-Crystallin mittels RT-PCR.

Hierbei konnte für APP zu allen Zeitpunkten eine signifikante mRNA-Überexpression nach pAd-APP-Infektion im Vergleich zur Kontrollinfektion nachgewiesen werden. Dies bestätigte die zuvor beschriebenen Ergebnisse (vgl. Punkt 4.4). Die Exposition mit proinflammatorischen Zytokinen bewirkte dagegen, wie schon unter 4.1.3 gezeigt, keine zusätzliche Veränderung der APP mRNA Expression, weder in den APP überexprimierenden Myotuben, noch in den Kontrollzellen (Abb. 38).

Auch die mRNA Expression des degenerativen Zellstressmarkers αB-Crystallin blieb nach APP-Überexpression, sowohl unter Kontrollbedingungen als auch im proinflammatorischen Milieu, unverändert und entsprach in etwa der Expression nach Infektion mit pAd-GFP (Abb. 38).

Die Analyse der in sIBM-Patienten hochregulierten Entzündungsmarker CXCL-9 und IL-1 β erbrachte keine Veränderung von deren mRNA-Expression unter APP-Überexpression im normalen Milieu. Lediglich durch die zusätzliche Inkubation mit Kombinationen von IL-1 β , IFN- γ und TNF- α konnte eine signifikante Induktion von IL-1 β und CXCL-9 auf mRNA Ebene festgestellt werden. Aber auch hier wurde kein Unterschied zwischen den mit pAd-APP-Virus infizierten, im Vergleich zu mit Kontroll-Virus behandelten Myotuben ersichtlich (Abb. 38).

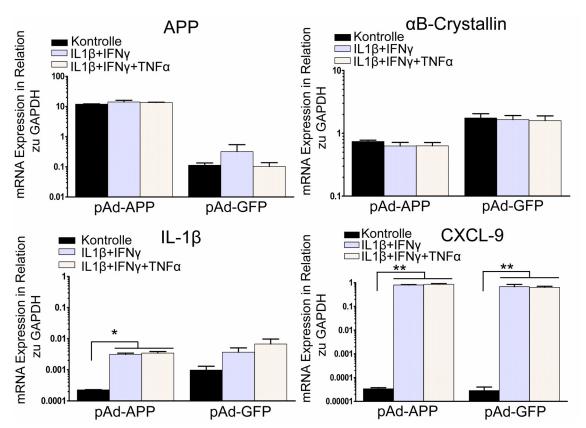


Abbildung 38: in vitro mRNA Expression Entzündungs- und Zellstress-assoziierter Markern in Myotuben nach adenoviraler Infektion. Infektion von nicht-pathologischen Myotuben mit 1.2×10^7 pfu / μ l pAd-APP bzw. pAd-GFP pro Well (24-Well Platte) für 24 h und anschließend 48 h Inkubation mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml). Dargestellt ist die Analyse der mRNA Expression von APP, α B-Crystallin, IL-1 β und CXCL-9 relativ zu GAPDH mit *p<0.05 und **p<0.01; n=3 / Gruppe.

4.4.2 Immunzytochemische Analyse der Expression von Degenerationsassoziierten Markern

Primäre nicht-pathologische Myotubenkulturen wurden mit pAd-APP bzw. mit pAd-GFP infiziert, wobei nach 24 h die zusätzliche Inkubation mit IL-1β und IFN-γ für 72 h erfolgte. Anschließend wurden verschiedene sIBM-relevante degenerative und zellstress-assoziierte Markern immunzytochemisch analysiert, wobei die GFP-Expression die Infektionseffizienz belegte.

Die Überexpression von APP induzierte keinen vermehrten Zelltod, was sowohl in der Hellfeldmikroskopie (Abb. 39 A), als auch durch die Propidiumiodidfärbung belegt werden konnte (Abb. 39 B). Darüber hinaus zeigten sich keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zu den mit pAd-GFP infizierten Myotuben, die auf Zellstressreaktionen hindeuten könnten (Abb. 39 A). Lediglich die zusätzliche

Exposition der Myotuben mit pro-inflammatorischen Zytokinen bewirkte eine signifikante Induktion von Zelltod, die der in Punkt 4.2.5 beschriebenen entsprach. Sie äußerte sich durch vermehrte Vakuolisierung, eine nekrotische Morphologie und der Verdopplung des Propidiumiodidsignals (Abb. 39). Jedoch fand sich kein Unterschied der Zelltodrate in APP-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den kontrollinfizierten (Abb. 39 B).

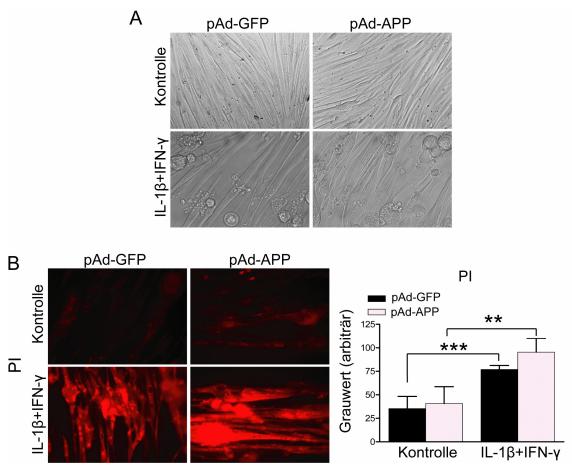


Abbildung 39: **Analyse** von **Zellstress** und Zelltod in Myotuben nach adenoviraler **Infektion** in vitro. Exposition von nicht-pathologischen Myotubenkulturen mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml) und IFN- γ (300 U / ml) für 72 h nach 24-stündiger Infektion mit 6×10^6 pfu / μ l pAd-APP bzw. pAd-GFP pro Well (8-Kammerobjektträger). A: Repräsentative Abbildungen der morphologischen Untersuchung mittels Hellfeldmikroskopie B: Repräsentative zytochemische Färbungen auf Zelltod mit PI, rechts: quantitativen Grauwertanalysen der Färbungen, wobei die arbiträren Mittelwerte + SD dargestellt sind mit **p<0,01 und ***p<0,001; n=3 / Gruppe. Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt bzw. die Kontrollen in A sind vergrößerte Ausschnitte aus Aufnahmen mit 20 x Objektiven.

Auch die Expression von αB-Crystallin und von phosphoryliertem Tau / Neurofilament unterschied sich nicht wesentlichen zwischen den APP- und Kontroll-infizierten Myotuben, so dass ein direkten Einfluss der Überexpression von APP *in vitro* hier nicht

nachweisbar war. Nur die Zytokin-bedingten, bereits unter Punkt 4.1.4 beschiebenen Effekte, waren zu beobachten (Abb. 40 A und B).

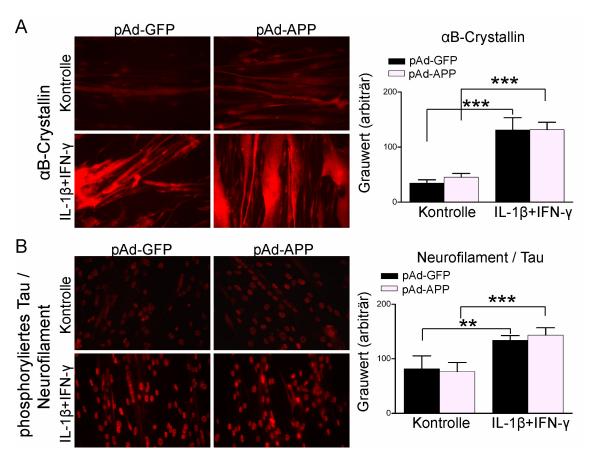


Abbildung 40: Immunzytochemische Analyse der Expression aB-Crystallin und phosphoryliertem Tau / Neurofilament in Myotuben nach adenoviraler Infektion. Exposition von nicht-pathologischen Myotubenkulturen mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml) und IFN- γ (300 U / ml) für 72 h nach 24-stündiger Infektion mit 6 x 10⁶ pfu / μ l pAd-APP bzw. pAd-GFP pro Well (8-Kammerobjektträger). Links: Repräsentative immunzytochemische und zytochemische Färbungen auf A: aB-Crystallin und B: phosphoryliertes Tau / Neurofilament. Rechts: quantitative Grauwertanalysen der Färbungen, wobei die arbiträren Mittelwerte + SD dargestellt sind mit **p<0,01 und ***p<0,001; n=3 / Gruppe. Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

Gleiches gilt für die Induktion von iNOS und BACE1. Beide Enzyme wurden in den Myotubenkulturen nur in Abhängigkeit von der Inkubation mit entzündlichen Zytokinen signifikant hochreguliert (*p<0,05 bis ***p<0,001), ohne dass die Überexpression von APP einen wesentlichen Einfluss auf deren Expression zeigte (Abb. 41 A und B).

Ergebnisse 98

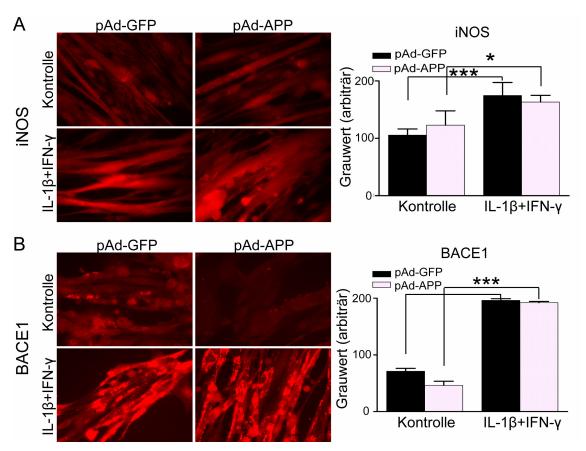


Abbildung 41: Immunzytochemische Analyse der Expression von iNOS und BACE1 in Myotuben nach adenoviraler Infektion. Exposition von nichtpathologischen Myotubenkulturen mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml) und IFN- γ (300 U / ml) für 72 h nach 24-stündiger Infektion mit 6 x 10⁶ pfu / μ l pAd-APP bzw. pAd-GFP pro Well (8-Kammerobjektträger). Links: Repräsentative immunzytochemische Färbungen auf A: iNOS und B: BACE1. Rechts: quantitative Grauwertanalysen der Färbungen, wobei die arbiträren Mittelwerte + SD dargestellt sind mit *p<0,05 und ***p<0,001; n=3 / Gruppe. Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

4.5 *In vitro* Analyse des pro-inflammatorischen Zellstresses bei der sIBM im Vergleich mit anderen Myopathien, ALS / Neuropathien und nicht-pathologischen Kontrollen

Im zweiten Hauptteil der Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob in der Skelettmuskulatur von sIBM Patienten prädisponierende Faktoren vorhanden sind, die die Akkumulation von β-Amyloid Marker Zelldegeneration als für unter pro-inflammatorischen Bedingungen fördern. Hierfür wurden primäre Muskelzellkulturen von sIBM Patienten mit denen von Patienten mit anderen Myopathien verglichen. Darüber hinaus wurde nicht-pathologischer Muskel und Biopsien von Patienten mit ALS / Neuropathien als Kontrollen bzw. als

Krankheitskontrollen in den *in vitro* Vergleich mit einbezogen. Bei der letzten Gruppe ist die Muskelschwäche auf keine primäre Muskelerkrankung, sondern auf neurogene Schädigungen zurückzuführen, so dass sie eine gute zusätzliche Kontrolle zum gesunden Muskel darstellt. Eine genaue Auflistung über die klinischen Daten der Patienten ist in Tabelle 11 zu finden. Hierbei wurde versucht ein etwa gleich altes Kollektiv aufzustellen.

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Patientengruppen und ihre klinischen Daten

Patientengruppe	Diagnose	Region der Muskelbiopsie	Patientenalter [Jahre]	Geschlecht
nicht- pathologische Kontrolle	nicht- pathologisch	Hüft-OP	50	W
	nicht- pathologisch	Hüft-OP	62	M
	nicht- pathologisch	Hüft-OP	68	W
sIBM	sIBM	unbekannt	53	M
	sIBM	unbekannt	57	M
	sIBM	unbekannt	70	M
andere Myopathien	Dysferlinopathie	unbekannt	42	M
	mitochondriale Myopathie	Musculus deltoideus, links	81	W
	unspezifische Myopathie	Musculus biceps brachii,links	54	W
ALS / Neuropathien	Neuropathie	Musculus vastus lateralis, links	41	W
	neurogene Atrophie, Vaskulitis	Musculus vastus lateralis, rechts	68	W
	ALS	unbekannt	50	М

4.5.1 Analyse der basalen in vitro Expression von entzündlichen und degenerativen Markern bei der sIBM, anderen Myopathien, ALS / Neuropathien und nicht-pathologischen Kontrollen

Zunächst wurde die basale mRNA Expression der Entzündungs-assoziierten Marker IL-1β, CXCL-9 und MHC-I nach 12 h und 36 h untersucht, wobei sich keine wesentlichen Unterschiede im RNA Level zwischen den einzelnen analysierten

Gruppen feststellen ließen (Abb. 42). Gleiches galt auch für die mit Degeneration und Zellstress in Verbindung stehenden Marker APP und αB-Crystallin (Abb. 42). Deren mRNA wurde in den Kulturen der sIBM Patienten etwa genauso stark exprimiert wie in denen anderer Myopathien, denen der Krankheitskontrollen (ALS / Neuropathie), oder der nicht-pathologischen Kontrollen.

Im Gegensatz dazu war die mRNA Expression von iNOS in den nicht-pathologischen Kontrollen basal nicht nachweisbar und im restlichen untersuchten Kollektiv nur sehr gering vorhanden (um Faktor 1000 vergrößert in Abb. 42 dargestellt).

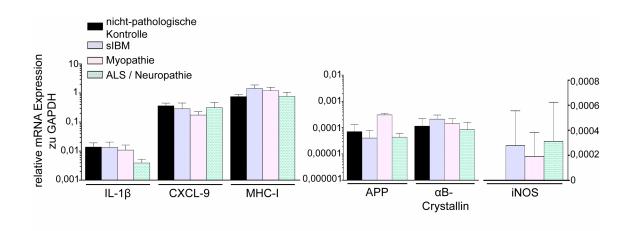


Abbildung 42: *in vitro* Analyse der basalen mRNA Expression von Entzündungsund Degenerations-assoziierten Markern in primären Myotubenkulturen. Dargestellt ist die Analyse der mRNA-Expression von IL-1 β , CXCL-9, MHC-I, APP, α B-Crystallin und iNOS relativ zu GAPDH nach 12 h, wobei die iNOS mRNA Expression zuvor mit dem Faktor 1000 multipliziert wurde. Die Expression in Myotubenkulturen von sIBM Patienten wurde mit der anderer Myopathien, ALS / Neuropathien und nichtpathologischer Kontrollen verglichen wobei α 1 Patienten pro Gruppe analysiert wurden.

Anschließend erfolgte die immunzytochemische Analyse der basalen Proteinexpression. Dabei zeigte sich, dass nach 40 h und 72 h vor allem IL-1β, CXCL-9, MHC-I und Nitrotyrosin in den Muskelzellen von sIBM Patienten signifikant höher exprimiert werden (mind. *p<0,05) verglichen zu den anderen Myopathien bzw. den nicht-pathologischen Kontrollen (Abb. 43). Interessanterweise lag das Expressionssignal dieser Marker auch in den Kulturen der Krankheitskontrolle (ALS / Neuropathie) signifikant über dem der nicht-patologischen Kontrollen.

Darüber hinaus konnte eine signifikant höhere Expression von iNOS im gesamten Patientenkollektiv gegenüber dem nicht-pathologischen Muskel ermittelt werden (Abb. 43). Damit einhergehend ließ sich bereits basal eine höhere Nitrierung von Tyrosinresten (immunzytochemische Nitrotyrosinfärbung) in den Patientenkulturen

feststellen, die vor allem in den sIBM-Kulturen und Krankheitskontrollen (ALS / Neuropathie) signifikant war (*p<0,05) (Abb. 43).

Bei den degenerations-assoziierten Markern wie APP, β-Amyloid oder phosphoryliertem Tau / Neurofilament waren keine wesentlichen Unterschiede in der basalen Expression zwischen der sIBM, anderen Myopathien und nicht-pathologischen Kontrollen *in vitro* nachzuweisen. Gleiches galt auch für das Zellstress-assoziierte αB-Crystallin (Abb. 43).

Allerdings war die Expression von APP und αB-Crystallin in den primären Myotubenkulturen der Patienten mit einer chronisch-neurogenen Schädigung (ALS / Neuropathie) signifikant erhöht (Abb. 43).

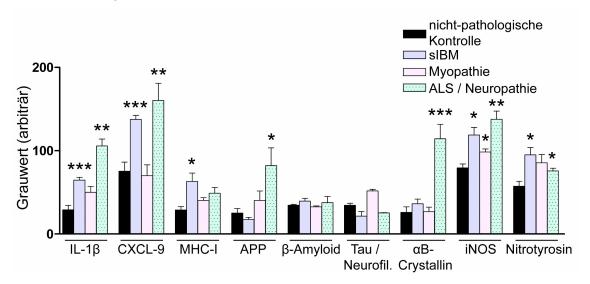


Abbildung 43: in vitro **Analyse** der basalen **Protein-Expression** von Entzündungsund **Degenerations-assoziierten** Markern primären Myotubenkulture. Dargestellt ist die statistische Grauwertanalyse der basalen CXCL-9, APP, β-Amyloid, IL-1β, MHC-I, phosphoryliertem Tau / Neurofilament, aB-Crystallin, iNOS und Nitrotyrosin nach 72 h Kultivierung ohne zusätzliche Zytokinexposition. Die Expression in Myotubenkulturen von sIBM Patienten wurde mit der anderer Myopathien, ALS / Neuropathien und nicht-pathologischer Kontrollen verglichen wobei n=3 Patienten pro Gruppe analysiert wurden. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.5.2 Analyse von entzündlichen und degenerativen Markern nach Exposition mit pro-inflammatorischen Zytokinen mittels RT-PCR

Im nächsten Versuch wurden die unter 4.5 genannten Gruppen durch 12 - und 36-stündige Inkubation mit Kombinationen von IL-1 β , IFN- γ und TNF- α einem inflammatorischen Milieu ausgesetzt und die Auswirkung auf die mRNA Expression der oben erwähnten Entzündungs- und Degenerationsmarker untersucht.

Hierbei zeigte sich ein deutlicher, entzündungsbedingter Anstieg der CXCL-9 mRNA Expression im gesamten Kollektiv gegenüber der basalen Expression. Darüber hinaus ergab der Vergleich zwischen den Gruppen eine signifikant stärkere Induktion in den Myotubenkulturen der sIBM Patienten (*p<0,05) gegenüber dem Rest, wenn die Inkubation mit allen drei Zytokinen erfolgte (Abb. 44). Eine ähnliche Induktion der mRNA Expression konnte für das pro-inflammatorische Zytokin IL-1β gezeigt werden. Auffallend war hierbei die z.T. signifikante Induktion der IL-1β mRNA in sIBM-Patientenkulturen unter Einfluss von Kombinationen mit IL-1β, verglichen zur Expression in den übrigen Gruppen (Abb. 44).

Bei der Analyse des MHC-I Komplexes ergab sich bereits nach 12-stündiger Inkubation im pro-inflammatorischen Milieu eine deutliche mRNA-Überexpression, die nicht wesentlich zwischen den untersuchten Kollektiven schwankte, jedoch in einer vergleichsweise höheren Expressionsrate in den sIBM-Patientenkulturen nach Inkubation mit bestimmten Zytokinkombinationen (IL-1β oder IFN-γ mit TNF-α) resultierte (12 h Werte nicht abgebildet). Nach 36 h war die MHC-I mRNA Expression unter entzündlichen Bedingungen im gesamten Kollektiv weiter gestiegen, allerdings mit deutlich größeren Schwankungen zwischen den untersuchten Gruppen. Dabei lag die MHC-I mRNA-Expression in den Kulturen von sIBM-Patienten z.T. unter den Übrigen (Abb. 44).

Für iNOS zeigte sich im Vergleich zu der basalen Expression bereits nach 12 h eine massive Entzündungs-bedingte Induktion im gesamten Kollektiv. Hierbei ergab sich eine z.T. erhöhte Expression in den sIBM-Patientenkulturen und in den Krankheitskontrollen (ALS / Neuropathie) verglichen mit den Kulturen anderer Myopathien oder nicht-pathologischer Kontrollen (Abb. 44).

Im Gegensatz dazu unterschied sich die mRNA Expression des mit degenerativem Zellstress in Verbindung stehenden αB-Crystallin und APP nicht wesentlich zwischen den untersuchten Gruppen und ließ sich auch weder nach 12 h noch 36 h durch proinflammtorische Zytokine modulieren. Lediglich die Inkubation mit allen drei Zytokinen über 36 h bewirkte eine Erhöhung der APP mRNA Expression in den sIBM-Patientenkulturen (Abb. 44).

Insgesamt ergab dieser Vergleich, dass im entzündlichen Milieu nur die iNOS, IL-1β und CXCL-9 mRNA Expression in den primären Myotubenkulturen der sIBM Patienten gegenüber der anderer Myopathien oder nicht-pathologischer Kontrollen z.T. signifikant erhöht ist, sich eine ähnliche Zunahme aber auch bei Patienten mit chronischneurogenen Schädigungen (Krankheitskontrollen) *in vitro* einstellt.

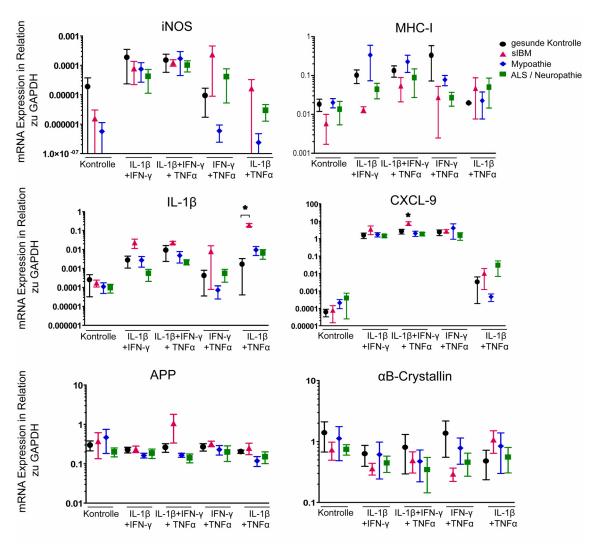


Abbildung 44: Analyse der mRNA Expression von Entzündungs- und Degenerations-assoziierten Markern unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Exposition von nicht-pathologischen Kontrollmyotubenkulturen, Myotubenkulturen von sIBM Patienten, Patienten mit anderen Myopathien oder ALS / Neuropathien zu Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml). Graphische Darstellung der Analyse der mRNA-Expression von iNOS, MHC-I, IL-1 β , CXCL-9, APP und α B-Crystallin in Relation zu GAPDH nach 12 h, wobei die Mittelwerte aus drei Experimenten +/- SD angegeben sind; *p<0,05.

4.5.3 Immunzytochemische Analyse entzündlicher und Degenerationsassoziierter Marker unter pro-inflammatorischen Bedingungen

Die Inkubation mit Kombinationen der Zytokine IL-1 β , IFN- γ und TNF- α über 40 h bis 72 h induzierte in allen untersuchten Gruppen (primäre Myotubenkulturen von Patienten mit sIBM, anderen Myopathien, ALS / Neuropathien bzw. nichtpathologischen Kontrollen) sowohl eine Hochregulation entzündlicher Marker, wie etwa IL-1 β , CXCL-9 und MHC-I, als auch Degenerations-assoziierter Proteine bei

beispielsweise APP, β -Amyloid oder phosphoryliertes Tau / Neurofilament. Weitere Zellstressmarker (iNOS, Nitrotyrosin und α B-Crystallin) wurden ebenfalls erhöht.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurde im Folgenden für einen der analysierten Marker eine Abbildung mit repräsentativen Färbungen sowie die entsprechende Grauwertanalyse nach 72-stündiger Zytokinexposition dargestellt. Die Ergebnisse der immunzytochemischen Expressionsanalyse der übrigen Marker wurde graphisch über die arbiträren Grauwerte nach 72 h wiedergegenen.

Im Detail zeigte sich bei den immunzytochemischen Untersuchungen basal eine stärkere Expression von CXCL-9 in den Myotubenkulturen von Patienten mit sIBM bzw. mit ALS / Neuropathien (vgl. Abb.43). Allerdings ergab sich ein fast 4-facher Anstieg des CXCL-9 Signals in den Myotubenkulturen nicht-pathologischer Kontrollen unter pro-inflammatorischen Bedingungen, wodurch die CXCL-9 Induktion hier mehr als doppelt so hoch ausfiel, als in den sIBM-Kulturen bzw. denen anderer Myopathien. Nur in den Kulturen von Patienten mit ALS / Neuropathien war nach 40- und 72-stündiger Zytokinexposition eine relativ schwache CXCL-9 Induktion zu verzeichnen (Abb. 45 A und B).

Auch die basale Expression des pro-inflammatorische Zytokins IL-1 β fiel zunächst in den Myotubenkulturen von Patienten mit sIBM bzw. ALS / Neuropathien höher aus (vgl. Abb.43). Dagegen führte die analoge Exposition mit Kombinationen von IL-1 β , IFN- γ und TNF- α in den nicht-pathologischen Kontrollen, in den anderen Myopathien und den sIBM-Patientenkulturen zu einer ähnlich starken Expressionszunahme. Hier war nur in den Kulturen von Patienten mit chronisch-neurogenen Schädigungen (Krankheitskontrollen) keine weitere IL-1 β Induktion zu verzeichnen (Abb. 45 C).

Basal unterschied sich die Expression des MHC-I Komplexes in den Myotubenkulturen der sIBM-Patienten von dem restlichen Kollektiv. Dagegen war nach 40- und 72-stündiger Inkubation im entzündlichen Milieu eine deutliche Induktion in allen vier Gruppen zu verzeichnen. Allerdings unterscheidet sich die Stärke der Expressionszunahme zwischen den nicht-pathologischen Kontrollen und den Patientenkulturen. Die Signalintensität der Kontrollen lag über dem restlichen Kollektiv, welches sich nicht voneinander unterschied (Abb. 45 D).

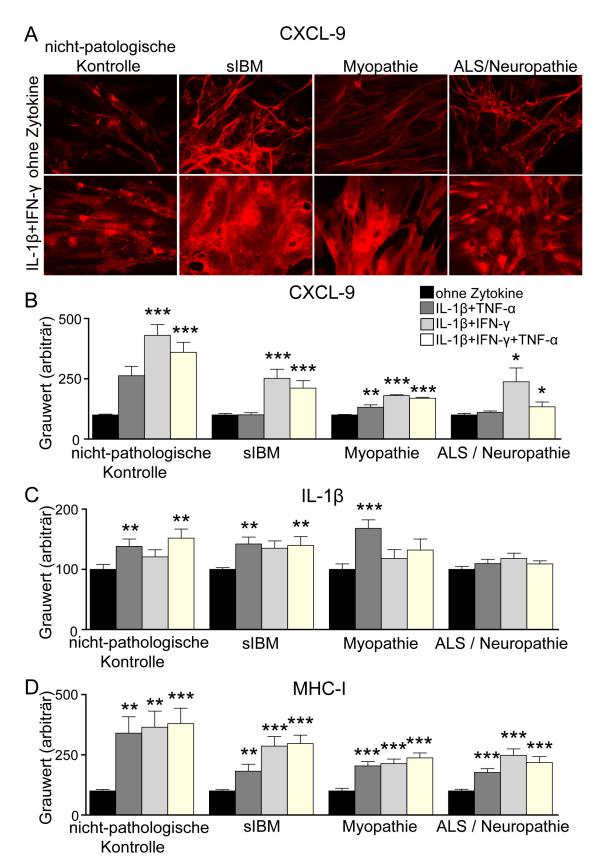


Abbildung 45: Immunzytochemische Analyse der CXCL-9, IL-1\beta und MHC-I Expression. Myotubenkulturen von nicht-pathologischen Kontrollen, sIBM Patienten, Patienten mit anderen Myopathien bzw. ALS / Neuropathien wurden für 40 h und 72 h mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml) inkubiert. A: Repräsentative Abbildungen der immunzytochemischen Färbung auf

CXCL-9 aus drei Experimenten nach 72 h. Die quantitative Grauwertanalyse der CXCL-9 (B), IL-1 β (C) sowie MHC-I (D) Expression nach 72 h Zytokinexposition wurden nach Normierung der baslen Expression auf 100 dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte + SD mit *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001. Die Aufnahmen in A wurden mit einem 40 x Objektiv angefertigt.

Bei der immunzytochemischen Analyse zeigte sich überraschender Weise, dass die basale APP Expression in den Kulturen der ALS / Neuropathie Patienten über den restlichen analysierten Gruppen lag (vgl. Abb.43). Dagegen induzierte die Inkubation mit pro-inflammatorischen Zytokinen über 40 h bis 72 h die APP Expression im gesamten Kollektiv um ein Vielfaches, ohne wesentliche Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 46 A).

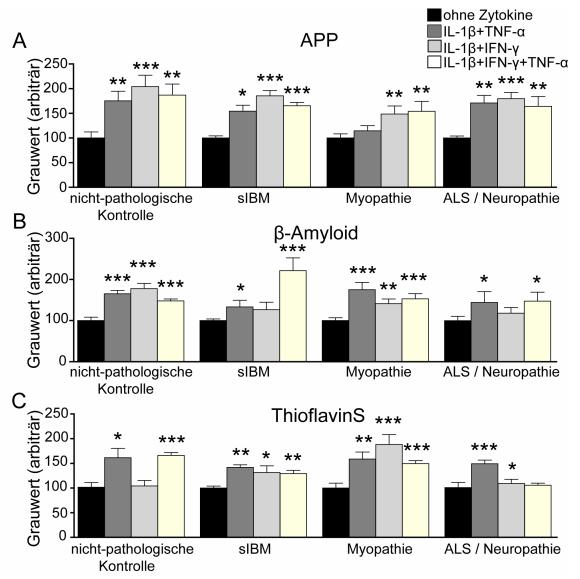


Abbildung 46: Immunzytochemische Analyse der APP und β-Amyloid Expression. Myotubenkulturen von nicht-pathologischen Kontrollen, sIBM Patienten, Patienten mit anderen Myopathien bzw. ALS / Neuropathien wurden für 40 h und 72 h mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml) inkubiert und anschließend immunzytochemisch auf A: APP und B: β -Amyloid bzw. zytochemisch mit ThioflavonS auf β -Amyloid-Aggregate (C) analysiert. Die quantitative

Grauwertanalyse der jeweiligen Expression nach 72 h Zytokinexposition wurden nach Normierung der baslen Expression auf 100 dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte + SD mit *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001.

Diese Zytokin-bedingte APP-Überexpression resultierte anschließend in einer deutlichen Akkumulation von β -Amyloid sowie dessen Aggregatbildung, wie sich in der immunzytochemischen Färbung mit einem β -Amyloid-spezifischen Antikörper (6E10), sowie in der zytochemischen Färbung mit ThioflavinS feststellen ließ. Allerdings konnte hier kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt werden (Abb. 46 B und C).

Gleiche Ergebnisse lieferte die Expressionsanalyse von phosphoryliertem Tau / Neurofilament. Dieses mit degenerativen Erkrankungen in Verbindung stehende Protein war in allen vier Gruppen ungefähr gleich stark unter Exposition zu proinflammatorischen Zytokinen exprimiert. (Abb. 47 B).

Obwohl basal für das Zellstress-assoziierte Hitze-Schock-Protein αB-Crystallin eine höhere Expression bei den Krankheitskontrollen (ALS / Neuropathie) zu verzeichnen war, kam es im gesamten Kollektiv zu einer etwa gleichsinnigen Expressionsinduktion unter entzündlichen Bedingungen (Abb. 47 A).

Die basal höhere Expression von iNOS in den Patientenkulturen verglichen zu den nicht-pathologischen Kontrollen wurde im entzündlichen Milieu wieder ausgeglichen, da hier in allen vier Gruppen eine etwa gleichsinnige Zunahme an iNOS erfolgte (Abb. 47 C). Und Entsprechend dieser iNOS Expression glich sich auch die Nitrierung in allen vier Gruppen einander unter entzündlichen Bedingungen nach bis zu 72 h an (Abb. 47 D).

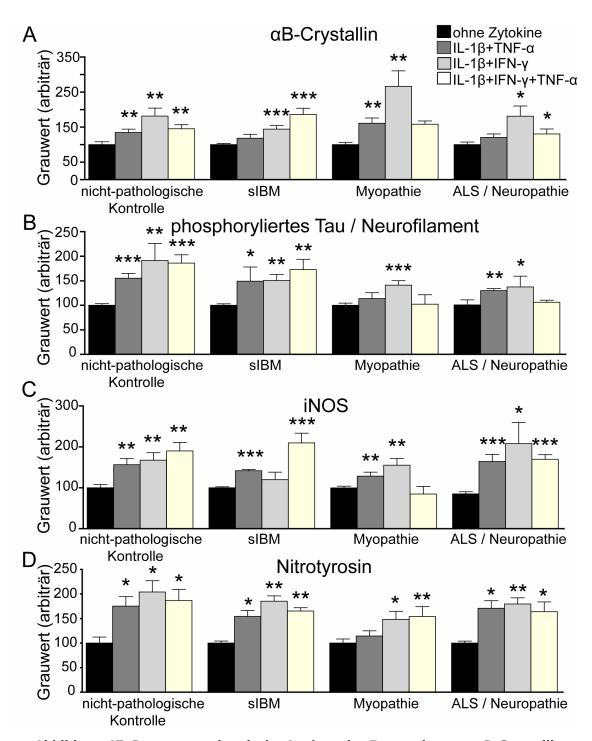


Abbildung 47: Immunzytochemische Analyse der Expression von aB-Crystallin, phosphoryliertem Tau / Neurofilament, iNOS und Nitrotyrosin. Myotubenkulturen von nicht-pathologischen Kontrollen, sIBM Patienten, Patienten mit anderen Myopathien bzw. ALS / Neuropathien wurden für 40 h und 72 h mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng / ml), IFN- γ (300 U / ml) und TNF- α (10 ng / ml) inkubiert und anschließend immunzytochemisch auf A: aB-Crystallin, B: phosphoryliertes Tau / Neurofilament, C: iNOS und D: Nitrotyrosin analysiert. Die quantitative Grauwertanalyse der jeweiligen Expression nach 72 h Zytokinexposition wurden nach Normierung der baslen Expression auf 100 dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte + SD mit *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001.

5. Diskussion

Zur Untersuchung möglicher Interaktionen zwischen entzündlichem Zellstress und der Akkumulation von β-Amyloid als Marker für zelluläre Degeneration wurde ein in vitro Modell in primären nicht-pathologischen Myotubenkulturen etabliert. Anhand dieses Modells konnte über mRNA- und Proteinexpressionsanalysen gezeigt werden, dass Muskelzellen unter entzündlichen Bedingungen sIBM-relevante Entzündungsmarker wie MHC-I, IL-1β und CXCL-9 überexprimieren. Ebenso bewirkte die Inkubation von nicht-pathologischen Myotuben mit pro-inflammatorischen Zytokinen eine signifikante Überexpression von APP, was wiederum eine vermehrte Akkumulation und Aggregatbildung von β-Amyloid zur Folge hatte. Auch andere degenerative Zellstressmarker (\alpha B-Crystallin und phosphoryliertes Tau) waren nachweisbar. Als Schlüsselenzym für den entzündungsbedingten Zellstress und nekrotischen Zelltod wurde iNOS identifiziert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass pro-inflammatorische Zytokine die Überexpression von BACE1 bedingen, wodurch es zu einer vermehrten Generierung von β-Amyloid kam. Durch den siRNAvermittelten knock-down von BACE1 oder eine pharmakologische BACE1-Blockade zytokinbedingte Hochregulation sIBM-relevanter Entzündungs-Degenerationsmediatoren, ebenso wie die Induktion von Zelltod, signifikant vermindert. Daraus lässt sich ableiten, dass BACE1 eines der maßgeblichen Moleküle bei der Entstehung von β-Amyloid-assoziiertem Zellstress unter entzündlichen Bedingungen bei der sIBM ist.

Nach adenoviral-vermittelter Überexpression von APP in nicht-pathologischen Myotuben zeigte sich keine vermehrte Suszeptibilität für entzündlichen oder degenerativen Zellstress *in vitro*. Passend dazu konnte kein Unterschied der entzündungs- oder degenerationsbedingten Zellstressinduktion in primären Myotubenkulturen von sIBM Patienten verglichen mit Kulturen nicht-pathologischer Patienten, von Patienten mit anderen Myopathien sowie ALS / Neuropathien gefunden werden.

5.1 Charakterisierung des *in vitro* Modells für entzündlichen Zellstress im Muskel

Die Pathologie der sIBM zeichnet sich durch entzündliche wie auch degenerative Mechanismen aus. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, diese zentralen

pathophysiologischen Mechanismen in einem *in vitro* Modell an primären Muskelzellkulturen abzubilden.

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre, nicht-pathologische Myotubenkulturen mit Kombinationen verschiedener entzündlicher Zytokine inkubiert, wodurch es zu einer signifikanten Induktion der mRNA Expression und / oder Proteinexpression von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen wie CXCL-9 und IL-1β kam. Vergleichbare Veränderungen wurden auch im Muskel von sIBM Patienten beobachtet [Raju et al. 2003;Schmidt et al. 2008;Tews and Goebel 1996a].

Insbesondere für IL-1β fand sich in der vorliegenden Arbeit eine durch Entzündung hervorgerufene Autoinduktion, wodurch sich die Ergebnisse früherer *in vitro* Studien, dass Muskelzellen unter pro-inflammatorischen Bedingungen dazu in der Lage sind, selbst Zytokine zu produzieren, bestätigen ließen [Nagaraju *et al.* 1998;Nagaraju 2001;Roy *et al.* 1991]. IL-1β scheint zudem eine wichtige pathophysiologische Rolle bei anderen, vor allem entzündlichen Myopathien zu spielen [Lundberg *et al.* 1997;Tews and Goebel 1996a]. Zusammen mit weiteren Zytokinen wie IFN-γ ist IL-1β daran beteiligt CD8⁺ T-Zellen in den Muskel zu locken [Raju *et al.* 2003]. Darüber hinaus kann es den Muskelzellen ermöglichen, Prozesse wie Autoimmunisierung und Antigen-Präsentation zu induzieren, wodurch das zytolytische Potential von zytotoxischen Zellen gesteigert wird [Tews and Goebel 1996a]. Solch eine chronisch entzündliche Umgebung kann dann direkt zur massiven Schädigung der Muskelzellen führen, was bereits für IL-1β [Broussard *et al.* 2004] und TNF-α [Li *et al.* 2005] gezeigt werden konnte.

Vor einigen Jahren wurde IL-1β darüber hinaus als mögliches Bindeglied zwischen Entzündung und der β-Amyloid-assoziierten Degeneration im Muskel vorgeschlagen [Dalakas 1998;Sondag and Combs 2004]. Auch beim Morbus Alzheimer wird die vermehrte β-Amyloidplaquebildung auf den Effekt zurückgeführt, den IL-1β auf die APP-Prozessierung ausüben kann [Griffin and Mrak 2002;Goldgaber *et al.* 1989;Rogers *et al.* 1999;Buxbaum *et al.* 1992].

Ein weiteres wichtiges Kennzeichen des krankhaft veränderten sIBM-Muskels ist die starke Überexpression von MHC-I, auch auf gesund erscheinenden Fasern [Karpati et al. 1988;Muntzing et al. 2003]. In dem hier vorliegenden in vitro Untersuchungen konnte eine ähnlich stark ausgeprägte, zytokinbedingte Induktion des MHC-I Komplexes sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene gezeigt werden, was mit den Befunden vorangegangenen Arbeiten im Einklang steht [Nagaraju et al. 1998;Nagaraju 2001;Roy et al. 1991]. Welche Rolle diese verstärkte MHC-I Expression in der Entstehung bzw. im Verlauf der sIBM bezieht, ist noch nicht abschließend geklärt.

Gleiches gilt für die Frage, ob sie ursächlich an der Krankheitsentstehung beteiligt ist, oder lediglich ein Epiphänomen darstellt. Vorstellbar wäre, dass MHC-I, welches auf gesunden Muskelfasern normalerweise nicht zu finden ist, die Antigen-abhängige Aktivierung zytotoxischer T-Zellen induziert. Ein für die sIBM kausal verantwortliches Antigen ist bislang jedoch nicht bekannt [Karpati et al. 1988;Muntzing et al. 2003].

Ein Anzeichen von Zellstress ist die Überexpression von sogenannten Chaperonen, die der Fehlfaltung von Proteinen vorbeugen [Ostermann *et al.* 1989] [Petersen and Lindquist 1988;Wu *et al.* 1988;Welch 1992]. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen besagte Zellstressreaktionen, da hier erstmalig eine massive, entzündungsbedingte Überexpression des Hitzeschockproteins αB-Crystallins in Muskelzellen *in vitro* beschrieben werden konnte. Eine ähnliche Überexpression von αB-Crystallin liegt auch *in vivo* im Muskel von sIBM Patienten vor [Banwell and Engel 2000]. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der β-Amyloid-Akkumulation und der vermehrten Bildung von αB-Crystallin in den sIBM-Muskelfasern *in vivo* besteht, wobei letzteres als Folge des gesteigerten degenerativen Zellstresses gebildet wird [Wojcik *et al.* 2006]. Auch andere Arbeiten unterstreichen die Bedeutung der αB-Crystallin-Produktion als Folge von entzündlichem Zellstress, um einer möglichen Zellschädigung vorzubeugen [Huey and Meador 2008].

Die Akkumulation von abberanten Proteinen innerhalb der Muskelfasern zählt zum zweiten wesentlichen pathologischen Merkmal der sIBM neben der Entzündung. Vor allem β-Amyloid und dessen Vorläuferprotein APP, aber auch andere degenerative Proteine wie phosphoryliertes Tau / Neurofilament wurden vermehrt in Muskelfasern von sIBM Patienten beschrieben [Askanas et al. 1994;Mirabella et al. 1996]. Durch die Kultivierung primärer, nicht-pathologischer Myotuben unter entzündlichen Bedingungen war nun auch erstmalig in dem hier neu etablierten in vitro Modell die vermehrte Bildung von APP, β-Amyloid und phosphoryliertem Tau zu verzeichnen, die morphologisch mit einer gesteigerten Vakuolisierung einher ging. Aus vorangegangenen Studien bekannt, APP, β-Amyloid und / oder ist dass phosphoryliertes Tau die Muskelzellen in vitro funktionell beeinträchtigen und morphologische Veränderungen induzieren, die denen von sIBM Muskelfasern ähnlich Hierzu zählen z.B. die Ausbildung von Vakuolen und intrazellulärer Proteinaggregate [Christensen et al. 2004; Fukuchi et al. 1998]. Solche Veränderungen konnten auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Zudem fand sich eine vermehrte in vitro Zellschädigung, Zunahme an Zellstress und Nekrose-induzierter Zelltod, was im Einklang mit vorangegangenen Befunden ist. Verschiedene

Arbeitsgruppen konnten sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* belegen, dass entzündungsfördernde Zytokine, APP sowie die Akkumulation von β-Amyloid direkt zytotoxisch auf die Muskelzellen in der sIBM wirken [Broussard *et al.* 2004;Li *et al.* 2005;Fukuchi *et al.* 1998;Jin *et al.* 1998;Kitazawa *et al.* 2006]. Allerdings wurden sie bislang *in vitro* nur getrennt von einander betrachtet. Dass ein Zusammenhang zwischen den einzelnen Faktoren bestehen kann und diese gemeinsam an den in der sIBM auftretenden Pathomechanismen beteiligt sind, konnte durch die *in vitro* Analysen der vorliegenden Arbeit untermauert werden.

Darüber hinaus wird APP selbst als Entzündungsmediator angesehen, bzw. werden ihm immun-modulierende Eigenschaften zugeschrieben, da es nach Ligandbindung des Zelloberflächen APP zu pro-inflammatorischen Reaktionen kommen kann bzw. die Freisetzung von unterschiedlichen pro-inflammatorischen Mediatoren induziert wird [Monning et al. 1995; Banati et al. 1994; Banati et al. 1993]. So kann das Cross-linking von APP die gesteigerte IL-1β Produktion durch APP exprimierenden Zellen bewirken, wie in primären Mausmikrogliazellen und humanen Monozytenzelllinien gezeigt werden konnte [Sondag and Combs 2004;Sondag and Combs 2006;Banati et al. 1993]. Somit könnte APP selbst mitverantwortlich sein, für die in dieser Arbeit beobachtete Zytokinproduktion der Muskelzellen und entzündliche und degenerative Folgekaskaden mit antreiben. In seiner möglichen Eigenschaft als Oberflächenrezeptor wird APP nicht nur die Fähigkeit zugeschrieben, β-Amyloid binden zu können [Lorenzo et al. 2000] sondern auch zur Ausbildung von Homo-und Heterodimeren in der Lage zu sein [Wang and Ha 2004]. Dadurch kann APP die Zell-Zell-Adhäsion kontrollieren und Downstream-Signalwege beeinflussen, wodurch es selbst zu seiner zellschädigen Wirkung mit beiträgt.

Die immunzytochemische Färbung mit dem monoklonalen Antikörper SMI31, der gegen phosphoryliertes Tau und Neurofilamente gerichtet ist, zeigte interessanterweise neben dem zytokinbedingten Anstieg des zytoplasmatischen Signals auch eine deutliche Anfärbung in Zellkernregionen. Normalerweise befinden sich Neurofilamente und phosphoryliertes Tau im Zytoplasma und in den Muskelfasereinschlüssen der sIBM-Patienten bzw. Ko-lokalisiert SMI31 mit den PHFs (paired helical filaments) in vivo und in vitro [Askanas et al. 1996a]. Als Mikrotubuli-assoziiertes Protein ist Tau hauptsächlich daran beteiligt die Integrität des Zytoskeletts aufrechtzuerhalten, aber bereits vor fast 30 Jahren wurde auch eine DNA-bindende Eigenschaft von Tau vermutet [Corces et al. 1980] und kürzlich konnte gezeigt werden, dass Tau sowohl doppel- als auch einzelsträngige DNA binden kann [Hua and He 2002]. Diese Interaktion schützt und stabilisiert die DNA in vitro [Hua and He 2003]. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Arbeiten in denen beschrieben wird, dass Aggregate positiv für

phophoryliertes Tau in Zellkernnähe zu finden sind und es zeigte sich, dass der in dieser Arbeit verwendete SMI31 Antikörper auch Zellkerne anfärben kann [Papasozomenos 1995;Temiz et al. 2008]. Darauf beruhen wahrscheinlich die hier beobachteten Färbeeigenschaften. Somit könnte es auch sein, dass die in dieser Arbeit beobachtete entzündungsbedingte Zunahme an phosphoryliertem Tau im Zellkern einen möglichen noch unbekannten Schutzmechanismus darstellen, der parallel zu den pathologischen, zytoplasmatisch vorkommenden Reaktionen abläuft. Allerdings sind für diese Hypothese bislang keine Daten aus der sIBM Forschung bekannt.

Insgesamt ist es in dieser Arbeit erstmalig gelungen ein *in vitro* Modell zu generieren, in dem im pro-inflammatorischen Milieu sIBM-relevante entzündliche Mediatoren zusammen mit degenerativen Markern überexprimiert werden, wodurch es möglich wurde ihre Abhängigkeit voneinander zu analysieren. Bislang konnte immer nur die Expression einzelner, hauptsächlich entzündlicher Mediatoren gezeigt werden.

Ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit war die Charkterisierung des Zellstressinduzierten Zelltodes. Durch entzündliche Stimuli wurden in den nicht-pathologischen Myotubenkulturen sowohl inflammatorische Mediatoren, als auch β-Amyloid-assoziierte Degenerationsmarker überexprimiert, was schließlich zum Tod der Zellen führte. Dies zeigte sich in morphologischen Analysen, der positiven Propidiumiodidfärbung sowie in durchflusszytometrischen Untersuchungen mit 7-AAD und AnnexinV. Entgegen dem klassischen programmierten Zelltod, der Apoptose, konnte hierbei ein Zugrundegehen der Zellen über Nekrose gezeigt werden, welche die Hauptzelltodform in entzündlichen Myopathien inklusive der sIBM ist [Olive et al. 1997;Behrens et al. 1997;Schneider et al. 1996; Tews and Goebel 1998; Nagaraju et al. 2000]. Auch wenn bisher keine klassischen Apoptosewege in der Myositis beschrieben wurden [Schneider et al. 1996;Olive et al. 1997;Inukai et al. 1997;Wang et al. 1997], konnte in einigen Muskelerkankungen, wie der Muskeldystrophie und spinalen Muskelatrophie bei Kindern, eine Suszeptibilität für apoptotischen Zelltod belegt werden [Tews and Goebel 1996b; Tews and Goebel 1997]. Dies konnte in den hier durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen so nicht für das in der vorliegenden Arbeit etablierten in vitro Modell gezeigt werden. Allerdings ist zu erwähnen, dass bei durchflusszytometrischen Zelltodanalysen immer ein gewisses Fehlerpotential vorliegt, da die Zellen vor der Färbung durch Trypsinisierung aus den Platten gelöst werden

müssen. Kurz angewandt zerstört Trypsin lediglich die Adhäsionsmoleküle, über die die Zellen an das Kulturgefäß haften. Wird jedoch zu lange inkubiert, verändert es die Zellmembranintegrität, wodurch eine anschließende Zelltodfärbung mit 7-AAD und AnnexinV fehlerbehaftet wäre. Dass es aber prinzipiell möglich ist, die Apoptoseinduktion durchflusszytometrisch nachzuweisen, konnte in dieser Arbeit, unter Verwendung von Staurosporin, im Rahmen der Caspaseinhibitions-Experimente gezeigt werden. Allerdings bewiesen diese Experimente auch, dass es nicht möglich ist, den Untergang der Zytokin-exponierten Zellen durch Caspaseinhibition zu verhindern, wodurch der Apoptoseweg in diesem *in vitro* Modell ausgeschlossen werden konnte. Somit scheint der in dieser Arbeit identifizierte Nekroseweg dem für die sIBM postulierten Zelltodmechanismus zu entsprechen.

Allerdings gibt einige, wenn auch umstrittene und widersprüchliche Ansätze, dass apoptotischer Zelltod mit in der sIBM involviert sein könnte [Behrens *et al.* 1997;Fyhr and Oldfors 1998;Olive and Ferrer 1999]. Grundlage für diese Vermutungen liefert die Alzheimerforschung. Hier gibt es zahlreiche *in vivo* und *in vitro* Studien die belegen, dass β-Amyloid mit der Apoptose in den Neuronen korreliert [Forloni *et al.* 1993;Li *et al.* 1996;Nishimura *et al.* 1998]. Solch eine Korrelation wurde versucht auch in der sIBM zu finden [Querfurth *et al.* 2001]. Sie sollte belegen, dass die intrazellulären β-Amyloid-Akkumulationen ein initiales Ereignis für den Zelltod sein können [Askanas and Engel 1998;Sarkozi *et al.* 1993;Yang *et al.* 1998b], oder doch nur als Epiphänomen unabhängig vom Muskelfaserzelltod auftreten [Pruitt *et al.* 1996]. Zwar ergab sich ein statistische Übereinstimmung von apoptotischen DNA-Fragmenten mit der β-Amyloid-Akkumulation, jedoch konnte keine Korrelation zwischen diesen wie in der AD gezeigt werden [Querfurth *et al.* 2001].

Da Muskelzellwachstum und Muskelzellfunktionen u.a. vom Nährstoffangebot, Hormonen und Wachstumsfaktoren abhängig sind [Brameld et al. 1998] und der Entzug letzterer Apoptose induzieren kann bzw. einige Wachstumsfaktoren sogar Apoptose unterdrücken können [Li et al. 2005; Mampuru et al. 1996; Stewart and Rotwein 1996], wurde in zahlreichen in vitro Studien die Anfälligkeit von Myotuben und Myoblasten in Apoptose zu gehen analysiert. Dies sollte Aufschluss darüber geben, unterschiedliche inwiefern Kulturbedingungen einen Einfluss auf den Zelltodmechanismus ausüben. In diesen Untersuchungen wurde klar, dass die basale Apoptoserate in vitro abnimmt, je weiter die Myotuben ausdifferenziert sind [Rehfeldt et al. 2004]. Auch immortalisierte Mausmuskelzelllinien, ähnlich den hier verwendeten humanen Myoblasten, weisen eine verminderte basale Apoptoserate auf, verglichen zu anderen Zelllinien [Mampuru et al. 1996; Migheli et al. 1997; Rehfeldt et al. 2004; Wittstock et al. 2003]. Ebenfalls zeigte sich kein vermehrter apoptotischer Zelltod

unter "Nährstoffmangelbedingungen", die der Ausdifferenzierung der Myotuben *in vitro* dienen und wodurch die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit hätten verfälschen werden können. Vielmehr werden ausdifferenzierte Myotuben in Kultur als apoptoseresistent erachtet [Wang and Walsh 1996]. Insgesamt betrachtet ist es möglich, dass die experimentellen Bedingungen für Muskelzellen ein antiapoptotisches Milieu darstellen und somit einen möglicherweise *in vivo* vorhandenen Apoptoseweg unter Zellkulturbedingungen nicht zum Tragen kommt.

5.2 Die Rolle von iNOS bei der Pathogenese der sIBM in vitro

Mögliche Ursachen für das Zugrundegehen der Muskelfasern in der sIBM sind vielfältig, wobei die β-Amyloid-Akkumulation als einer zentralen Schädigungsmechanismen angenommen wird (siehe oben). Doch die toxische Wirkung von β-Amyloid allein scheint nicht ausschließlich ein direkter Auslöser des Zelltodes zu sein. So besteht z.B. ein direkter Zusammenhang zwischen Zellstress und der Überexpression von iNOS, sowie der dadurch bedingten vermehrten NO-Produktion in entzündlichen Myopathien einschließlich der sIBM [De Paepe et al. 2004; Tews and Goebel 1998; Wanchu et al. 1999]. Darüber hinaus ko-lokalisierten Marker für oxidativen Stress (oxidative DNA-Schädigungen) und iNOS mit den β-Amyloid-Ablagerungen in den vakuolisierten Muskelfasern von sIBM-Patienten [Tateyama et al. 2003; Yang et al. 1998b]. Dass Skelettmuskelzellen dazu in der Lage sind iNOS zu exprimieren, konnte schon vor mehr als 10 Jahren gezeigt werden [Park et al. 1996] und in einer Mausmuskelzelllinie gelang die Induktion von iNOS durch die Inkubation mit pro-inflammatorischen Zytokinen [Park et al. 1996; Williams et al. 1994]. Auch zeigte sich eine schädliche Wirkung von NO und oxidativer Metabolite für die Muskelzellen [Li et al. 2005]. Die Daten dieser Arbeit belegen nun, dass humane nichtpathologisch veränderte Myotuben unter pro-inflammatorischen Bedingungen in der Lage sind, iNOS zu induzieren, vor allem wenn sie mit IL-1β und IFN-γ exponiert werden. Sowohl auf mRNA- als auch auf der Proteinebene konnte eine signifikante Überexpression von iNOS gezeigt werden. Diese ging mit einer verstärkten NO-Produktion in den Myotuben einher und könnte aufgrund des parallelen Zeitverlaufes mit der beobachteten β-Amyloid-Akkumulation assoziiert sein. Wie auch bei sIBM Patienten [Yang et al. 1996], konnte in dieser Arbeit eine entzündungsbedingte Zunahme an Nitrotyrosin festgestellt werden. Nitrotyrosin, welches das Ergebnis der Nitrierung von proteingebundenen oder freien Tyrosinresten ist, ist ein Marker für den durch NO- bzw. dessen Metabolite (z.B. Peroxinitrit) ausgelösten oxidativen Zellstress,

der in dieser Arbeit letztendlich für den beobachteten Zelltod mitverantwortlich ist. für Sauerstoffintermediate als auch Sowohl für reaktive NO konnte vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass sie Apoptose, aber auch Nekrose in unterschiedlichen Zelltypen induzieren können [Buttke and Sandstrom 1994;Stangel et al. 1996]. Dazu passend belegen die Daten dieser Arbeit erstmals, dass ein spezifischer iNOS Inhibitor (1400W) nicht nur den NO-vermittelten Zellschaden im entzündlichen Milieu effektiv vermindern kann, sondern dadurch auch mehr Zellen überleben. In vivo Studien belegten, dass in SJL Mäusen die gesteigerte NO-Produktion mit dem Grad der spontan ausgebildeten Myositis korreliert und dass durch die Gabe eines NOS-Inhibitors die Schwere der Erkrankung gemindert werden konnte [Tamir et al. 1995]. Darüber hinaus kam es in einem weiteren in vivo Modell für Muskelentzündung bei Ratten zum Rückgang entzündlicher Zellen, sowie zur Reduktion an nekrotischen Muskelfasern in Folge der NOS Inhibition [Pizza et al. 1998].

Allerdings konnte der unspezifische NOS Inhibitor LNMMA in dem hier gezeigten in vitro Modell weder die NO-Produktion noch den Zelltod so effektiv beeinflussen, wie der iNOS-spezifische Inhibitor. Daraus lässt sich ableiten, dass unter therapeutischen Gesichtspunkten eine mögliche spezifische iNOS Blockade bei der sIBM erfolgen sollte.

Obwohl die in dieser Arbeit erhaltenen Daten in sich stimmig sind und mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen belegt werden konnten, muss Untersuchungen von NO und dessen Derivaten immer ein gewisses Fehlerpotential in betracht gezogen werden. Vor allem bei kolorimetrischen Methoden können Fehler aufgrund der im Überstand enthaltenen Proteine und Materialien auftreten. Auch mangeln vor allem ältere Verfahren an ausreichender Sensitivität und setzten komplizierte Aufbereitungsschritte der zu untersuchenden Proben voraus [Feelisch et al. 2002]. Darüber hinaus manche Probenentnahmekönnen Aufbereitungstechniken selbst zur Generierung der zu analysierenden Spezies führen bzw. die verwendeten Labormaterialen NOx Kontaminationen enthalten. Dies muss vor allem dann berücksichtigt werden, wenn ganz bestimmte NO-Spezies mit Verfahren wie FIA (flow injection analysis) und CLD (chemiluminescence detection) gemessen werden. Um diese versuchsbedingten Fehler in der NO-Messung ausschließen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit indirekte Methoden zur Messung der von den Zellen gebildete NO Menge angewandt. Zum einen durchflusszytometrisch über einen Farbstoff, der nur in Anwesenheit von NO fluoresziert. Dadurch lässt sich von der Signalintensität auf die NO-Produktion schließen. Zum anderen wurde die NO-Generierung durch den durch sie bedingten Zellschaden ermittelt. Hierfür wurde der

Grad der Nitrierung von Tyrosinen mittles eines immunzytochemischen Nachweises festgestellt.

5.3 Die entzündungsbedingte BACE1 Überexpression als Auslöser muskulärer Degeneration *in vitro*

Die Überexpression von APP im Mausmuskel oder Muskelzellen kann vakuoläre degenerative Veränderungen induzieren, die denen der sIBM ähnlich sind [Askanas et al. 1996b; Fukuchi et al. 1998; Jin et al. 1998; Kitazawa et al. 2006; Sugarman et al. 2006]. Daher könnte zusätzlich zu einem Entzündungs-induziertem Zellstress durch NO, die direkte toxische Wirkung von APP (wie bereits zuvor beschrieben) oder die β-Amyloid-Akkumulation zum Muskelschaden in vitro und in vivo führen [Christensen et al. 2004; Querfurth et al. 2001]. Durch Entzündung könnte dieser Prozess im Sinne einer Autoinduktion weiter verstärkt werden, indem es zu einer Zunahme der APP-Prozessierung in Folge der gesteigerten BACE1 Expression kommt. Ein solcher Mechanismus konnte tatsächlich kürzlich in Astrozyten nachgewiesen werden, in denen nach Exposition mit IL-1β, IFN-γ und TNF-α die β-Amyloidsekretion verstärkt wurde und zumindest IFN-γ zur erhöhten BACE1 Bildung führte [Blasko et al. 2000; Cho et al. 2007; Hong et al. 2003]. Dass die BACE1 Expression auch bei der sIBM pathopysiologisch relevant ist, konnten Vattemi und Mitarbeiter kürzlich zeigen [Vattemi et al. 2001; Vattemi et al. 2003]. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen wird BACE1 im Muskel von sIBM Patienten überexprimiert, wobei eine Ko-lokalisation mit β-Amyloid in den vakuolisierten Fasern zu finden ist. Zusätzlich zur sIBM wurde BACE1 auch in nekrotischen, sowie in kleinen regenerierenden Muskelfasern von Patienten mit anderen Myopathien überexprimiert. Allerdings war hier die Immunoreaktivität eher diffus verteilt, was für eine zytoplasmatische Lokalisation spricht [Vattemi et al. 2003]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in den kultivierten nicht-pathologischen Myotuben im Zytoplasma nur eine schwache Immunoreaktivitat gegen BACE1, was sich mit den Daten einer vorangegangenen Arbeit deckt [Vattemi et al. 2003]. In unseren in vitro Experimenten bewirkte die Kultivierung der nichtpathologischen Myotubenkulturen mit pro-inflammatorischen Zytokinen dramatischen Anstieg in der BACE1 Expression, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Auf subzellulärer Ebene war das Protein dann vor allem an Membranen aber auch zytoplasmatisch lokalisiert, wie die immunzytochemischen Färbungen belegen. Die entzündungsbedingt gesteigerte Hochregulation von BACE1 könnte maßgeblich an einer vermehrten β-Amyloidgenerierung in vitro beteiligt sein. Frühere

Arbeiten belegen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen APP-Prozessierung, β-Amyloidbildung und dem BACE1 Proteinlevel besteht [Ehehalt et al. 2003;Luo et al. 2001; Singer et al. 2005]. Es zeigte sich, dass unter basalen Bedingungen die BACE1 Transkription signifikant geringer ist als die von APP, sowohl in neuronalen als auch in nicht neuronalen Zellen [Li et al. 2006]. Dieses erklärt, warum in "gesunden" Zellen nur ein geringer Teil des APP über den amyloidogenen Weg prozessiert wird. Dagegen bewirkt ein nur minimaler Anstieg von BACE1 drastische Veränderungen der β-Amyloid-Menge in vitro und in vivo [Li et al. 2006]. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen nun erstmal, dass solche Veränderungen durch Zytokin-induzierten Zellstress Muskelzellen in vitro hervorgerufen werden. Es existieren in Untersuchungen zur Interaktion zwischen APP und BACE1. Beide Proteine können als Bestandteil sogenannter Lipd Rafts (cholesterinreiche Mikrodomänen Zellmembranen) vorkommen [Bothwell and Giniger 2000; Ehehalt et al. 2003; Riddell et al. 2001; Simons et al. 1998], wodurch die amyloidogene Spaltung von APP gefördert wird. Da aufgrund des Aufbaus dieser Rafts APP und BACE1 vermutlich in von einander getrennten Rafts vorkommen, könnten sie nach Endozytose in den Endosomen zusammentreffen und dort APP prozessiert werden. Diese Hypothese wird Studien die dass Endozytose durch mehrere belegt zeigen, β-Amyloidgenerierung über die β-Sekretasespaltung notwendig ist [Perez et al. 1999;Koo and Squazzo 1994;Huse et al. 2000;Ehehalt et al. 2003]. Dies könnte erklären, warum β-Amyloid in der sIBM nur intrazellulär gefunden wird. Gleichzeitig könnte es Behauptungen untermauern die besagen, dass die extrazellulär vorliegenden β-Amyloidablagerungen in der AD intrazellulären Ursprungs sind und als Überreste der zugrunde gegangenen Neuronen im extrazellulären Raum verbleiben bzw. das intrazelluläre β-Amyloidablagerungen schon lange vor den Extrazellulären auftreten und weitaus toxischer für die Neuronen sind [Glabe 2001;Zheng et al. 2009;Ohyagi 2008;LaFerla et al. 2007;Lee et al. 2006;Yang et al. 1995;Yang et al. 1998a].

Um den Einfluss der BACE1-basierenden APP Prozessierung auf die Pathogenese der sIBM *in vitro* ananlysieren zu können, fiel die Wahl auf den siRNA-vermittelten *knockdown* mit Nanofektin. Bei diesem Verfahren wird der natürliche, in jeder Zelle vorkommende Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi) zur Hilfe genommen, um mit einer synthetisch hergestellten siRNA die Expression des spezifischen Zielgens (hier BACE1) zu unterbinden. Die zusätzliche Wahl eines auf Nanopartikeln basierenden Transfektionsreagenz erhöhte die Transfektionseffizienz mit geringstmöglicher toxischer Wirkung für die Zellen, wodurch unerwünschte Nebeneffekte minimiert

wurden. So konnte in der vorliegenden Arbeit belegt werden, dass der si-RNAvermittelte knock-down von BACE1 nicht nur die BACE1 mRNAund Proteinexpression reduziert, sondern vielmehr auch eine signifikante Reduktion der β-Amyloid Akkumulation und Aggregation erfolgt. Ähnliches ergab sich zuvor in in vivo RNAi Experimenten bzw. bei BACE1-defizienten Mäusen, die als Tiermodelle zur Erforschung der Alzheimer Erkrankung dienen. Hierbei führte die Stilllegung des BACE1 Gens zur Verhinderung der amyloidogenen Neuropathologie sowie von β-Amyloid-Ablagerungen wodurch sich die kognitive Defizite der Mäuse verbesserten [McConlogue et al. 2007]. Ebenso ergaben die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten BACE1 knock-down Experimente, dass die Verhinderung der amyloidogenen APP-Prozessierung auch mit einer deutlichen Reduktion von sIBMrelevanten Entzünndungs- und Degenerations-assoziierten Markern wie IL-1ß, CXCL-9, MHC-I, phosphoryliertem Tau / Neurofilament und αB-Crystallin einher geht. Dies führte zu einer deutlichen Verbesserung des entzündungsbedingt aufgetretenen Zellstresses in vitro. Darüber hinaus bewirkte die reduzierte BACE1 Expression den dramatischen Rückgang der iNOS-Induktion sowie des sich anschließenden NO-Stresses und Zelltodes unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Da die genannten Effekte auch durch eine pharmakologische BACE1 Blockade erzielt werden konnten, könnte die Inhibition von BACE1 zukünftig eine interessante therapeutische Option darstellen. Entsprechende Substanzen werden momentan bereits für die Therapie der Alzheimer Erkrankung an Mäusen erprobt [Hussain et al. 2007;Ghosh et al. 2008], allerdings stellt ihre orale Bioverfügbarkeit bzw. ihre relativ kurze Stabilität bislang das größte Problem für Studien am Menschen dar. Auch unter Sicherheitsgesichtspunkten könnte sich die BACE1 Blockade als vorteilhaft erweisen, da bislang noch keine Nebenwirkungen bekannt sind. Im Gegensatz dazu kann ein alternativer Ansatz, die Generierung von β-Amyloid über die Hemmung der γ-Sekretase zu blockieren [Citron et al. 1997;De Strooper et al. 1998], zu schwerwiegenden Folgeerscheinungen führen. Denn die γ-Sekretase ist nicht nur in die β-Amyloid Generierung involviert, sondern hat auch andere Substrate wie Ire1p [Niwa et al. 1999] und Notch [De Strooper et al. 1999; Song et al. 1999; Zhang et al. 2000]. Letzteres fördert als Signalprotein während der Embryonalentwicklung die Differenzierung zahlreicher Zelltypen, wodurch die Inhibition der y-Sekretase schädliche Effekte nach sich ziehen würde [Bothwell and Giniger 2000]. Im Vergleich zu Presenilin knock out Mäusen (Presenelin ist als Untereinheit der y-Sekretase aktiv in die APP Prozessierung involviert, vgl. S.11 der Einleitung) sind BACE1-defiziente Mäuse vital und weisen keine spontanen kognitiven Einschränkungen auf [Li et al. 2006;Roberds et al. 2001;Shen et al. 1997]. Dies ließ den Einsatz der BACE1-Inhibitoren bei der AD-Therapie am Mausmodell befürworten.

Die Daten der vorliegenden Arbeit bekräftigen die Erprobung der BACE1-Blockade für die sIBM-Therapie und manifestieren den engen Zusammenhang zwischen Entzündung und der β-Amyloid-assoziierten Degeneration im Muskel.

5.4 Einfluss der APP Überexpression auf entzündliche und degenerative Pathomechanismen *in vitro*

Da die Akkumulation von β-Amyloid eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der sIBM zu spielen scheint (siehe oben), liegt die Vermutung nahe, dass sich durch Überexpression von APP in vitro pathologische Veränderungen in den Muskelzellen induzieren lassen. Somit ließe sich ein weiteres Zellkulturmodell der sIBM etablieren. Rekombinante humane Adenovieren sind ein gutes Werkzeug, um fremde DNA in postmitotische Zellen zu bringen, in denen so große Mengen des transferierten Gens relativ lang andauernd exprimiert werden können [Askanas et al. 1996b]. Tatsächlich gelang es auf diese Weise bereits vor mehr als 10 Jahren APP in kultivierte Muskelzellen zu transferieren und dessen Überexpression zu erzielen [Askanas et al. 1996b; Askanas et al. 1997]. Auf Grundlage dieser Untersuchungen sollte in der vorliegenden Arbeit das in vitro Modell weiter ausgebaut werden, um den Einfluss der degenerativen Komponente auf die übrigen pathophysiologischen Erscheinungsformen der sIBM in vitro analysieren zu können. Entsprechend der ursprünglichen Daten konnte eine Virusdosis-abhängigen APP Überexpression gefolgt von einer vermehrten β-Amyloid Akkumulation gezeigt werden, ähnlich der bei sIBM-Patienten [Askanas et al. 1997]. Dass diese sich nicht in den mit Kontrollvirus infizierten Myotuben nachweisen läßt, belegen nicht nur frühere [Askanas et al. 1996b;Askanas et al. 1997], sondern auch diese aktuellen Daten. Allerdings resultierte die APP-Überexpression in den vorangegangenen Studien in einer ausgeprägten Vakuolisierung der Muskelfasern gefolgt von einer degenerativen Morphologie innerhalb von 3-5 Tagen, die denen der sIBM ähnlich sind. Dieser Effekt trat nach der Kontrollinfektion mit Viren ohne APP Gen oder antisense APP nicht auf. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Zwar führte die APP-Überexpression zu einer β-Amyloid-Akkumulation, sowie zur vermehrten Vakuolisierung, letztere konnte in ähnlicher Weise aber auch nach Kontrollinfektion mit einem GFP-exprimierenden Virus ohne APP Akkumulation beobachtet werden. Dies könnte heißen, dass es sich nur um unspezifische Effekte durch die Infektion gehandelt hat. Jedoch ist es auch möglich, dass das große GFP Protein andere Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel hat und

somit zelltoxischer sein kann, als die in früheren Studien verwendeten Kontrollviren, wodurch sich die abweichenden Ergebnisse begründen ließen.

Interessanter Weise konnten in dem vorliegenden Modell, bei dem erstmalig der Einfluss der APP-Überexpression auf mehrere sIBM-relevanten Entzündungs- und Degenerationsmarkern zugleich untersucht wurde, keine Veränderung in deren mRNA-Expression festgestellt werden. Darüber hinaus konnte keine Zunahme an Zellstress durch eine gesteigerte Produktion von phosphoryliertem-Tau / Neurofilament, iNOS oder αB-Crystallin beschrieben werden. Ebenfalls führte die APP-Überexpression in dieser Arbeit nicht zu einer gesteigerten Zelltodrate. Dies steht im Widerspruch mit einer anderen Arbeit, in der die vermehrte αB-Crystallin-Produktion, sowie dessen Akkumulation *in vitro* als Folge der APP Überexpression beschrieben wurde [Wojcik *et al.* 2006], bzw. eine deutliche Zelltodzunahme zu verzeichnen war [Lu *et al.* 2003;Querfurth *et al.* 2001].

Aber nicht nur diese früheren in vitro Daten waren die Grundlage für die hier durchgeführten Untersuchungen, sonder auch ein zu Beginn der Arbeit veröffentlichtes Mausmodell, mit dem die Bedeutung von β-Amyloid in der sIBM näher beleuchtet werden sollte. Hier wurde humanes APP unter dem MCK-Promotor im Muskel der Mäuse überexprimiert und die Anreicherung des toxischen βAmyloid42 durch eine Mutation im Presenilin (Untereinheit der y-Sekretase) gewährleistet (MCK-APP / PS1 Mäuse) [Kitazawa et al. 2006]. Entgegen den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten, konnten in diesem Mausmodell sowohl degenerative als auch entzündliche Charakteristika der sIBM nachgewiesen werden. Hier zeigte sich neben einer verstärkten Akkumulation von β-Amyloid und Vakuolisierung der Fasern auch eine altersabhängige Anreicherung von phosphoryliertem Tau. Darüber hinaus wiesen die Mäuse deutliche CD8+ T-Zell Infiltrate im skelettalen Muskel auf, die auf Entzündungsreaktionen ähnlich derer der sIBM hindeuten. Solch ein Phenotyp bzw. das Auftreten von entzündlichem Zellstress war auch das erhoffte Ziel der vorliegenden Arbeit. So hätten sich neue Wege zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen möglichen primären degenerativen Mechanismen und nachfolgender entzündlicher Zellstressreaktionen erschließen können. Allerdings konnte dies nicht über die adenovirale APP Überexpression in den Myotuben in vitro erzielt werden.

Unter Umständen hat die Dauer der Infektion nicht ausgereicht, um einen Möglichen Effekt der APP Überexpression auf weitere degenerative oder sogar entzündliche Zellstressreaktionen beobachten zu können. Vielleicht ist das hier gewählte Zellkulturmodel zu artifiziell gewesen. Auch die zusätzliche Inkubation mit proinflammatorischen Zytokinen bewirkte keine weiteren Veränderungen als die, die bereits zuvor im entzündlichen Milieu festgestellt werden konnten (siehe oben).

5.5 Suszeptibilität primärer sIBM-Myotubenkulturen gegenüber entzündlichen Zellstress

Da die Prävalenz der sIBM zwischen einzelnen ethnischen Gruppen unterschiedlich ausfällt [Badrising *et al.* 2000;Morosetti *et al.* 2008;Phillips *et al.* 2000;Shamim *et al.* 2002], entstand die Vermutung, dass multiple genetische Faktoren an der Entwicklung und Progression der sIBM mitbeteiligt sein könnten. Diese Beobachtungen lieferten die Grundlage für die Untersuchungen dieser Arbeit, bei denen geklärt werden sollte, ob prädisponierende Faktoren im sIBM Muskel eine durch pro-inflammatorischen Zellstress induzierte Akkumulation von β-Amyloid begünstigen können.

Für diese Untersuchungen wurden primäre Myotubenkulturen von Patienten mit sIBM, anderen Myopathien, ALS / Neuropathien und von nicht-pathologischem Muskel angelegt. An ihnen wurde die Expression der für die sIBM relevanten Marker sowohl basal als auch im entzündlichen Milieu analysiert und ein Vergleich zwischen den Gruppen erstellt. Die myopathischen Kulturen sollten einen direkten Vergleich der sIBM Kulturen mit anderen primären Muskelerkrankungen gewährleisten. Die Kulturen von ALS / Neuropathie-Patienten dienten dagegen als Krankheitskontrollen, zusätzlich zu den normalen Kontrollen der nicht-pathologischen Muskeln, da ihre Muskelerkrankung sekundär, als Folge von neuronalen Schädigungen auftritt. In der Literatur wurde diese Gruppe bereits als Kontrolle / Krankheitskontrolle zur sIBM bebschrieben [Tateyama *et al.* 2009]. Diese gezielte Auswahl an Vergleichspartnern sollte es ermöglichen potentielle prädisponierende Faktoren im sIBM aufzudecken, die die Akkumulation von β-Amyloid unter pro-inflammatorischen Bedingungen fördern.

Auf der mRNA Ebene wiesen die Myotuben von sIBM Patienten eine erhöhte Expression von iNOS, IL-1β und CXCL-9, sowie einen Trend zur Induktion von APP auf. Dagegen schien die basale Proteinexpression sowohl von Entzündungs- als auch von Degenerations-assoziierten Markern in allen Patientenkulturen verglichen zu den nicht-pathologischen Kontrollen erhöht zu sein. Insbesondere die entzündlichen Marker, aber auch einige Zellstressmoleküle wie iNOS und αB-Crystallin waren vor allem in den sIBM-Patienten und Neuropathie-Kulturen signifikant höher exprimiert.

Allerdings verlieren die auf mRNA Ebene beobachteten Expressionsunterschiede zwischen den sIBM Patientenkulturen und den restlichen Gruppen an Relevanz, da sich die Proteinexpression im Patientenkollektiv ähnelte und nur in Bezug auf die nichtpathologischen Kontrollen signifikante Unterschiede festgestellt werden konnten. Diese beobachtete verstärkte *in vitro* Expression von entzündlichen Mediatoren belegt deren allgemeine Bedeutung im kranken Muskel *in vivo*[Figarella-Branger *et al.* 2003], die aber nicht sIBM spezifisch ist. Noch deutlicher wurde dieser Effekt bei den

Degenerations-assoziierten Molekülen, für die keine Unterschiede in der basalen Proteinexpression im gesamten Kollektiv gefunden werde konnten. Lediglich APP war in den Krankheitskontrollen verstärkt exprimiert. Das lässt sich aber darauf begründen, dass es als Akut-phasen-protein bei regenerativen Prozessen in der Neuropathie erhöht vorkommen kann [Selkoe 1994].

Die Exposition aller vier untersuchten Gruppen zu pro-inflammatorischen Zytokinen über einen längeren Zeitraum bewirkte eine signifikante Überexpression von sowohl entzündlichen (wie MHC-I, CXC-9, IL-1β), als auch degenerativen (wie APP, β-Amyloid) oder anderen Zellstressmarkern (iNOS, Nitrotyrosin, αB-Crystallin, phosphoryliertes Tau). Die Intensität der Expressionszunahme von APP, β-Amyloid, phosphoryliertem Tau / Neurofilament und iNOS unterschied sich zwischen den Gruppen nicht wesentlich. Vor allem aber CXCL-9 war in den Kulturen der Kontrollen fast doppelt so stark exprimiert und auch die MHC-I Induktion war hier verstärkt. Dagegen zeigte sich in den Myotubenkulturen von Patienten mit Myopathien eine weitaus gesteigerte Proteinexpression an αB-Crystallin, bedingt durch proinflammatorische Zytokine. Diese unterschiedlich starke Zunahme der Proteinexpression zwischen den Gruppen kann auf den Unterschied in der basalen Expression zurückzuführen sein, da vor allem die Kulturen, deren basale Expression gering war den höchsten Anstieg aufwiesen.

Im Wesentlichen konnte aber kein Unterschied in der entzündungs- oder degenerationsbedingten Zellstressinduktion in primäre Myotubenkulturen von sIBM Patienten verglichen mit Kulturen von Patienten mit anderen Myopathien und ALS / Neuropathien, sowie im Vergleich zu nicht-pathologischer Kontrollen im proinflammatorischen Milieu gefunden werden.

Auf Grund der deutlichen β -Amyloid-Akkumulation in der sIBM, die oft als initiales Ereignis für die sIBM Patologie angesehen wird [Morosetti *et al.* 2008] und der starken Überexpression entzündlicher und degenerativer Marker, wurde sich auch eine vergleichsweise höhere Expression dieser Moleküle in der vorliegenden *in vitro* Studie erhofft. Wider Erwarten war das nicht der Fall und es konnte auch keine spontane β -Amyloid-Akkumulation festgestellt werden.

Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen stammen die Myotuben, an denen die Untersuchungen durchgeführt wurden, von Satellitenzellen ab. Diese ruhenden Zellen werden *in vivo* vor allem beim Muskelwachstum oder Muskelreparatur aktiviert. Sie besitzen außergewöhnliche Proliferationsfähigkeiten und können entweder dazu dienen einen neuen Pool an regenerativen Zellen aufzubauen oder durch Fusionierung *in vivo* aber auch *in vitro* multinukleäre Myotuben bilden [Shi and Garry 2006]. Mehrere Studien, die sich mit dem Wachstumsverhalten von

Satellitenzellen in vitro beschäftigten, belegen, dass die Zahl und Proliferationsfähigkeit sowie ihre Fusionsfähigkeit mit der Zeit abnimmt [Wright and Shay 2002]. Auch bei progressiven Muskelerkrankungen mit häufigen Degenerationsund Regenerationszyklen konnte mit der Zeit ein Abfall der Regenerierungsfähigkeit verzeichnet werden, da die Satellitenzellen "vergreisen" [Decary et al. 1997;Decary et al. 2000], insbesondere bei der sIBM [Morosetti et al. 2008]. Demzufolge könnten die primären Myotubenkulturen der unterschiedlichen Patientengruppen den tatsächlichen in vivo Zustand nicht ausreichend genug widerspiegeln, wodurch sich grundlegende Rückschlüsse auf mögliche pathogenetische Ursachen nur teilweise aufklären lassen. Diese Vermutung lässt sich aber durch Untersuchungen widerlegen, in denen primäre sIBM Myoblasten keine morphologischen Abnormalitäten im Vergleich zu normalen Kontrollen aufweisen. Sie konnten normal ausdifferenziert werden und waren entsprechend der Kontrollen anregbar [McFerrin et al. 1999; Morosetti et al. 2008]. Auch zeigte sich keine gesteigerte APP Expression in den sIBM Kulturen verglichen zu den Kontrollen, was im Einklang mit den vorliegenden Daten ist. Somit scheint es nicht möglich zu sein in den sIBM Kulturen, die aus den Satellitenzellen der Patienten stammen, spontane APP Akkumulationen nachzuweisen. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Faktoren, die für die APP und β-Amyloid-Akkumulation verantwortlich sind, nicht in "Kurzzeitkulturen" funktionieren, sondern vielmehr auf eine alternde zelluläre Umgebung angewiesen sind. Neben Mechanismen der unzureichenden Proteindegeneration über das Proteasom kommt insbesondere eine primäre Entzündung in Frage, die notwendig ist, um die Akkumulation von β-Amyloid aus zu lösen (s.oben).

Insgesamt konnte in dem hier durchgeführten Vergleich von sIBM-Patientenkulturen mit anderen Myopathien, Neuropathien und nicht-pathologischem Muskel keine höhere Suszeptibilität zu pro-inflammatorischen Zytokinen und somit zu den durch sie bedingten Zellstressreaktionen festgestellt werden.

Allerdings zeigte sich in einer kürzlich durchgeführte Studie, dass Myotuben von s-IBM Patienten, die über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, und somit dem "Alterungsprozess" ähneln, anfälliger für degenerative Veränderungen auf Grund von unterschiedlichen Stressfaktoren sind, als gleichaltrige Kontrollen [Morosetti *et al.* 2008]. Vielleicht wären diese Unterschiede auch in den vorliegenden Untersuchungen deutlich geworden, wenn sie über einen längeren Zeitpunkt in der ausdifferenzierten Kultur hätte gehalten werden können.

Im Einklang mit Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe [Morosetti *et al.* 2008], konnte auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass es prinzipiell schwieriger ist aus sIBM-Patientenbiopsien Myoblasten zu isolieren, im Vergleich zu

gleichaltrigen gesunden Kontrollen, aber auch verglichen zu Patienten mit Neuropathien. Neben einer verlangsamten Proliferations- und Verdopplungszeit, kam es auch viel häufiger und früher zum Proliferationsstop. Somit scheint die Regenerationskapazität der sIBM-Satellitenzellen vielleicht konstitutiv beeinträchtigt zu sein. Diese Hypothese könnte das Auftreten von verkürzten Telomeren bereits in "jungen" sIBM Kulturen belegen, da der altersabhängige Regenerationsverlust von der Verkürzung der Telomere begleitet wird [Morosetti et al. 2008]. Im Vergleich zu den sIBM-Kulturen wuchsen und fusionierten in der vorliegenden Arbeit die Kulturen der Patienten mit Neuropathie weitaus schneller und scheinen somit reaktiver zu sein, wodurch sich ihre stärkere Reaktivität auf die pro-inflammatorischen Zytokine erklären ließe. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Satellitenzellen der Neuropathiepatienten durch die andauernden, zugrundeliegenden neurogenen Schädigungen länger angeregt wurden bzw. reaktiver sind als andere Satellitenzellen und somit auch ein höheres Regenerierungspotential aufweisen.

Andere Faktoren, die die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit grundlegend mitbestimmen können, auf die wir aber keinen Einfluss hatten, waren das Alter der Patienten, das unterschiedliche Geschlecht und die unterschiedlichen Vorgeschichten der Patienten. Im Rahmen dieser experimentellen, zeitlich abgegrenzten Arbeit war man darauf angewiesen in relativ kurzer Zeit geeignete Patientenproben zu erhalten und diese erfolgreich zu kultivieren. Dabei war es leider nur schwer realisierbar Biopsate von Patienten mit einer relativ gleichen Altersverteilung zu erhalten, die alle möglichst männlichen Geschlecht abstammten. gleichen, Dies hätte gewährleisten können, dass die gewonnenen Satellitenzellen in etwa den gleichen "Vergreisungs"- Status und somit eine ähnliche Reaktivität auf äußere Stimuli aufweisen, wodurch eine noch bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse sichergestellt gewesen wäre. Die Wahl eines beispielsweise komplett männlichen Kollektivs hätte mögliche, geschlechtsspezifisch auftretende Unterschiede ausgeschlossen. Dies kann bei der sIBM durchaus eine Rolle spielen, da Männer im Verhältnis 3:1 häufiger betroffen sind als Frauen. Ein weiterer, nicht unwesentlicher Faktor, über den aus ethischen Gründen keine Auskunft gegeben wurde, war die Krankengeschichte der Patienten sowie der nicht-pathologischen Kontrollen. Welche möglichen früheren Therapien wurden durchgeführt? Welche medikamentösen Behandlungen gab es in der Vergangenheit und lagen zusätzliche Erkrankungen vor? Alles Fragen, die einen wichtigen Einfluss auf den Status aller Biopsate und deren Suszeptibilität auf die hier angewandten äußeren Stimuli haben könnten.

Ein weiterer Punkt, der ursächlich dafür sein kann, dass in dieser Arbeit die Muskelzellen der sIBM Patienten per se nicht sensitiver auf pro-inflammatorische Zytokine reagieren, als Zellen anderer Patienten oder Kontrollen, kann die eingesetzte Zytokin-Konzentration sein. Diese entspricht zwar physiologisch vorkommenden Mengen, ist aber dennoch vergleichsweise hoch gewählt, wodurch die erzielten Ergebnisse gesättigte Reaktionen darstellen könnten. Möglicherweise hätten sich minimale Unterschiede zwischen den Patientengruppen dosisabhängig besser beobachten lassen und eine frühzeitigere Sensibilität der sIBM Kulturen auf ein entzündliches Milieu hätte sich besser herausstellen lassen.

In diesen *in vitro* Untersuchungen konnten somit keine wesentlichen Unterschiede in der Akkumulation von β-Amyloid bzw. in der Expression der übrigen analysierten Proteine zwischen der sIBM und anderen Erkrankungen festgestellt werden. Ebenfalls scheinen die Myotubenkulturen der sIBM Patienten in dem hier angewandten Modell nicht sensitiver auf pro-inflammatorische Zytokine zu reagieren, als die Zellen des restlichen analysierten Kollektivs.

ZUSAMMENFASSUNG 127

Zusammenfassung

Bei der sporadischen Einschlußkörperchenmyositis handelt es sich um die häufigste erworbene Myopathie bei Patienten über 50 Jahre. Der Krankheitsverlauf ist gekennzeichnet durch eine langsam fortschreitende Schwäche und Atrophie von distalen und proximalen Muskeln, in Folge dessen die Patienten innerhalb von 5 bis 20 Jahren auf Gehhilfen bis hin zum Rollstuhl angewiesen sind. Histologisch charakteristisch sind Akkumulationen von aberranten Proteinen wie β-Amyloid und hyperphosphoryliertem Tau, aber auch ausgeprägte entzündliche Reaktionen der Muskelfasern, wodurch diese selbst dazu beitragen von zytotoxischen T-Zellen attackiert zu werden. Allerdings ist bisher unzureichend verstanden, ob es einen Zusammenhang zwischen den entzündlichen und degenerativen Pathomechanismen bei der sIBM gibt, oder es sich um unabhängig von einander auftretende Phänomene handelt. Es gibt bis heute keine effektiven Behandlungsmöglichkeiten für diese schwerwiegende Erkrankung. Zur Entwicklung besserer und gezielter Therapieansätze Verständnis ein detailliertes der zugrundeliegenden pathogenetischen Mechanismen unabdingbar.

Diese Arbeit hatte daher die Untersuchung von möglichen Interaktionen zwischen entzündlichem Zellstress und der Muskeldegeneration, ausgelöst durch β-Amyloid, zum Ziel.

Hierbei ist es erstmalig gelungen, ein *in vitro* Model für entzündlichen Zellstress in primären nicht-pathologischen Myotubenkulturen zu entwickeln. Über mRNA- sowie Proteinexpressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass Muskelzellen im pro-inflammatorischen Milieu nicht nur sIBM-relevante Entzündungsmarker wie IL-1β, CXCL-9, und MHC-I exprimieren, sondern es auch zu einer Überexpression von APP kommt, der sich die Akkumulation und Aggregation von β-Amyloid anschließt. Gleichzeitig wurden auch andere Degenerations- und Zellstressmarker wie phosphoryliertes Tau / Neurofilament und αB-Crystallin induziert.

Die anhand dieses Modells durchgeführten Zellstress- und Zelltoduntersuchungen belegen, dass iNOS eine entscheidene Rolle in der Pathogenese der sIBM spielt. Es konnte eine Entzündungs-bedingte iNOS Induktion sowie die daraus resultierende NO Produktion aufgezeigt werden, die im engen Zusammenhang mit Zellstress und nekrotischem Zelltod stehen. Durch die gezielte Blockade von iNOS konnten diesen Mechanismen entgegengewirkt werden, wodurch sich neue Ansätze für zukünftige Therapieansätze ergeben könnten.

Als weiters Schlüsselenzym im Zusammenspiel von entzündlichen und degenerativen Pathomechanismen im Kontext der sIBM wurde BACE1 identifiziert. Erstmalig konnte

ZUSAMMENFASSUNG 128

in dieser Arbeit die zytokinbedingte Hochregulation von BACE1 *in vitro* belegt werden, welche maßgeblich für die Akkumulation von β -Amyloid verantwortlich war. Über einen siRNA-vermittelten *knock-down* von BACE1 bzw. dessen pharmakologische Inhibition gelang es, die β -Amyloid-Akkumulation zu vermindern, wodurch es zu einem deutlichen Expressionsrückgang von sIBM-relevanten Entzündungs- und Degenerationsmarkern kam. Ebenfalls konnte so der Zytokin-induzierte Zelltod der Muskelzellen *in vitro* abgeschwächt werden.

Dagegen zeigten sich nach adenoviraler APP-Überexpression keine Veränderung in der mRNA- oder Proteinexpression von sIBM-relevanten Markern. Auch konnte keine Zunahme an Zellstress oder Zelltod in den APP-überexprimierenden Myotuben festgestellt werden.

Um zu überprüfen, ob sich die im primär gesunden Muskel erhobenen Befunde auch auf die pathologische Situation übertragen lassen, wurden im zweiten Teil dieser Arbeit endogene Entzündungs- und Degenerationsprozesse direkt aus den Muskeln von sIBM Patienten ananlysiert und mit anderen (neuro-)muskulären Erkrankungen verglichen. Bei den sIBM Patienten war basal eine höhere *in vitro* mRNA Expression von iNOS, IL-1β, CXCL-9 sowie tendenziell von APP zu verzeichnen, sowie eine höhere Proteinexpression von IL-1β, CXCL-9, MHC-I, iNOS und Nitrotyrosin. Darüber hinaus zeigte sich in allen untersuchten Gruppen eine Zytokin-bedingte Hochregulation von sIBM-relevanten Entzündungs-, Degenerations- und Zellstressmediatoren. Eine vermehrte Akkumulation von β-Amyloid fand sich dagegen ebenso wenig, wie Unterschiede in der Expression der übrigen analysierten Proteine.

Zusammenfassend belegen die Daten, dass ein direkter Zusammenhang zwischen entzündlichem Zellstress und der β -Amyloid-assoziierten Degeneration im Muskel *in vitro* besteht, wobei die chronische Entzündung als ein wesentlicher Faktor für die Überexpression von APP und Akkumulation von β -Amyloid im Skelettmuskel der Patienten postuliert werden kann. Darüber hinaus scheinen die Muskelzellen der sIBM Patienten nicht prädisponiert dafür zu sein, sensitiver auf entzündliche Stimuli zu reagieren, als Zellen anderer Patienten oder Kontrollen.

Die gewonnen Daten können somit wesentlich zu einem besseren Verständnis der sIBM beitragen und helfen, effektivere Therapiestrategien gegen diese schwere Erkrankung zu entwickeln.

AUSBLICK 129

7. Ausblick

Im nächsten Schritt sollen die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse aus der Zellkultur in die in vivo Situation übertragen werden. Dafür stehen verschiedene Modellsysteme zur Verfügung. Zum einen soll die Wirksamkeit der iNOS bzw. BACE1 Inhibitoren an sogenannten MCK-APP / PS1 Mäusen [Kitazawa et al. 2006] ("IBM-Mäuse") getestet werden, dem einzigen derzeit zur Verfügung stehenden Mausmodell, in dem sich Teile der sIBM Pathologie wiederfinden. Gleichzeitig soll die Generierung und Etablierung von zwei neuen Mauslinien erfolgen. Hierbei soll es sich zum einen um NOS2- (iNOS-) defiziente MCK-APP / PS1 Mäuse und zum andern um BACE1defiziente MCK-APP/ PS1 Mäuse handeln. Mit Hilfe dieser in vivo Modelle sollen die erhobenen, vielversprechenden in vitro Daten untermauert werden. Gleichzeitig sollten sich anhand dieser Tiermodelle auch die möglichen neuen Therapiestrategien besser evaluieren lassen. Dies ist vor allem unter dem Gesichtspunkt vielversprechend, da BACE1 Inhibitoren derzeit in der Alzheimer Therapie erprobt werden [Hussain et al. 2007] und NOS-Inhibitioren bei Erkrankungen wie dem septischen Schock [Kilbourn et al. 1990] und der Rheumathoiden Arthritis [McCartney-Francis et al. 1993] bereits als Therapeutikum angesehen werden.

Da es sich bei der sIBM um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, in der verschiedene pathogenetische Faktoren gegenseitig beeinflussen, ist das neu etablierte *in vitro* Modell eine gute Grundlage für weitere experimentelle Untersuchungen von Zusammenhängen zwischen Entzündung und Degeneration. Die Ko-Kultivierung der primären Myotubenkulturen mit CD8⁺ T-Zellen im entzündlichen Milieu würde beispielsweise eine Erweiterung des Modells darstellen, die die entzündliche *in vivo* Situation noch besser reflektiert.

8. Literaturverzeichnis

Amato, A. A., Gronseth, G. S., Jackson, C. E., Wolfe, G. I., Katz, J. S., Bryan, W. W., and Barohn, R. J. 1996. Inclusion body myositis: clinical and pathological boundaries. *Ann.Neurol.* 40, 581-586.

- Amemiya, K., Granger, R. P., and Dalakas, M. C. 2000. Clonal restriction of T-cell receptor expression by infiltrating lymphocytes in inclusion body myositis persists over time. Studies in repeated muscle biopsies. *Brain* 123 (Pt 10), 2030-2039.
- Andrew G.Engel and Clara Franzini-Armstrong. Myology, third edition McGraw-Hill Medical Publishing Division. 2004.
- Askanas, V., Alvarez, R. B., Mirabella, M., and Engel, W. K. 1996a. Use of antineurofilament antibody to identify paired-helical filaments in inclusion-body myositis. *Ann.Neurol.* 39, 389-391.
- Askanas, V. and Engel, W. K. 1998. Sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies: current concepts of diagnosis and pathogenesis. *Curr.Opin.Rheumatol.* 10, 530-542.
- Askanas, V. and Engel, W. K. 2001. Inclusion-body myositis: newest concepts of pathogenesis and relation to aging and Alzheimer disease. J.Neuropathol.Exp.Neurol. 60, 1-14.
- Askanas, V. and Engel, W. K. 2002. Inclusion-body myositis and myopathies: different etiologies, possibly similar pathogenic mechanisms. *Curr.Opin.Neurol.* 15, 525-531.
- Askanas, V. and Engel, W. K. 2003. Proposed pathogenetic cascade of inclusion-body myositis: importance of amyloid-beta, misfolded proteins, predisposing genes, and aging. *Curr.Opin.Rheumatol.* 15, 737-744.
- Askanas, V. and Engel, W. K. 2005. Molecular pathology and pathogenesis of inclusion-body myositis. *Microsc.Res.Tech.* 67, 114-120.
- Askanas, V. and Engel, W. K. 2006. Inclusion-body myositis: a myodegenerative conformational disorder associated with Abeta, protein misfolding, and proteasome inhibition. *Neurology* 66, S39-S48.
- Askanas, V. and Engel, W. K. 2007. Inclusion-body myositis, a multifactorial muscle disease associated with aging: current concepts of pathogenesis. *Curr.Opin.Rheumatol.* 19, 550-559.
- Askanas, V., Engel, W. K., Alvarez, R. B., McFerrin, J., and Broccolini, A. 2000. Novel immunolocalization of alpha-synuclein in human muscle of inclusion-body myositis, regenerating and necrotic muscle fibers, and at neuromuscular junctions. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 59, 592-598.
- Askanas, V., Engel, W. K., Bilak, M., Alvarez, R. B., and Selkoe, D. J. 1994. Twisted tubulofilaments of inclusion body myositis muscle resemble paired helical filaments of Alzheimer brain and contain hyperphosphorylated tau. *Am.J.Pathol.* 144, 177-187.

Askanas, V., Engel, W. K., Mirabella, M., Weisgraber, K. H., Saunders, A. M., Roses, A. D., and McFerrin, J. 1996b. Apolipoprotein E alleles in sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathy. *Ann.Neurol.* 40, 264-265.

- Askanas, V., McFerrin, J., Alvarez, R. B., Baque, S., and Engel, W. K. 1997. Beta APP gene transfer into cultured human muscle induces inclusion-body myositis aspects. *Neuroreport* 8, 2155-2158.
- Askanas, V., McFerrin, J., Baque, S., Alvarez, R. B., Sarkozi, E., and Engel, W. K. 1996c. Transfer of beta-amyloid precursor protein gene using adenovirus vector causes mitochondrial abnormalities in cultured normal human muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 1314-1319.
- Badrising, U. A., Maat-Schieman, M., van Duinen, S. G., Breedveld, F., van Doorn, P., van Engelen, B., van den, H. F., Hoogendijk, J., Howeler, C., de Jager, A., Jennekens, F., Koehler, P., van der, L. H., de Visser, M., Verschuuren, J. J., and Wintzen, A. R. 2000. Epidemiology of inclusion body myositis in the Netherlands: a nationwide study. *Neurology* 55, 1385-1387.
- Badrising, U. A., Schreuder, G. M., Giphart, M. J., Geleijns, K., Verschuuren, J. J., Wintzen, A. R., Maat-Schieman, M. L., van Doorn, P., van Engelen, B. G., Faber, C. G., Hoogendijk, J. E., de Jager, A. E., Koehler, P. J., de Visser, M., and van Duinen, S. G. 2004. Associations with autoimmune disorders and HLA class I and II antigens in inclusion body myositis. *Neurology* 63, 2396-2398.
- Banati, R. B., Gehrmann, J., Czech, C., Monning, U., Jones, L. L., Konig, G., Beyreuther, K., and Kreutzberg, G. W. 1993. Early and rapid de novo synthesis of Alzheimer beta A4-amyloid precursor protein (APP) in activated microglia. *Glia* 9, 199-210.
- Banati, R. B., Gehrmann, J., Monning, U., Czech, C., Beyreuther, K., and Kreutzberg, G. W. 1994. Amyloid precursor protein (APP) as a microglial acute phase protein. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 20, 194-195.
- Banwell, B. L. and Engel, A. G. 2000. AlphaB-crystallin immunolocalization yields new insights into inclusion body myositis. *Neurology* 54, 1033-1041.
- Barohn, R. J., Amato, A. A., Sahenk, Z., Kissel, J. T., and Mendell, J. R. 1995. Inclusion body myositis: explanation for poor response to immunosuppressive therapy. *Neurology* 45, 1302-1304.
- Behrens, L., Bender, A., Johnson, M. A., and Hohlfeld, R. 1997. Cytotoxic mechanisms in inflammatory myopathies. Co-expression of Fas and protective Bcl-2 in muscle fibres and inflammatory cells. *Brain* 120 (Pt 6), 929-938.
- Bender, A., Behrens, L., Engel, A. G., and Hohlfeld, R. 1998. T-cell heterogeneity in muscle lesions of inclusion body myositis. *J.Neuroimmunol.* 84, 86-91.
- Blasko, I., Veerhuis, R., Stampfer-Kountchev, M., Saurwein-Teissl, M., Eikelenboom, P., and Grubeck-Loebenstein, B. 2000. Costimulatory effects of interferongamma and interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha on the synthesis of Abeta1-40 and Abeta1-42 by human astrocytes. *Neurobiol.Dis.* 7, 682-689.

Bogle, R. G., Baydoun, A. R., Pearson, J. D., Moncada, S., and Mann, G. E. 1992. Larginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. *Biochem.J.* 284 (Pt 1), 15-18.

- Bossy-Wetzel, E., Schwarzenbacher, R., and Lipton, S. A. 2004. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat.Med.* 10 Suppl, S2-S9.
- Bothwell, M. and Giniger, E. 2000. Alzheimer's disease: neurodevelopment converges with neurodegeneration. *Cell* 102, 271-273.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254.
- Brameld, J. M., Buttery, P. J., Dawson, J. M., and Harper, J. M. 1998. Nutritional and hormonal control of skeletal-muscle cell growth and differentiation. *Proc.Nutr.Soc.* 57, 207-217.
- Broccolini, A., Engel, W. K., Alvarez, R. B., and Askanas, V. 2000. Paired helical filaments of inclusion-body myositis muscle contain RNA and survival motor neuron protein. *Am.J.Pathol.* 156, 1151-1155.
- Broussard, S. R., McCusker, R. H., Novakofski, J. E., Strle, K., Shen, W. H., Johnson, R. W., Dantzer, R., and Kelley, K. W. 2004. IL-1beta impairs insulin-like growth factor i-induced differentiation and downstream activation signals of the insulin-like growth factor i receptor in myoblasts. *J.Immunol.* 172, 7713-7720.
- Brune, B. 2003. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death.Differ.* 10, 864-869.
- Bussiere, T., Bard, F., Barbour, R., Grajeda, H., Guido, T., Khan, K., Schenk, D., Games, D., Seubert, P., and Buttini, M. 2004. Morphological characterization of Thioflavin-S-positive amyloid plaques in transgenic Alzheimer mice and effect of passive Abeta immunotherapy on their clearance. *Am.J.Pathol.* 165, 987-995.
- Buttke, T. M. and Sandstrom, P. A. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol.Today* 15, 7-10.
- Buxbaum, J. D., Oishi, M., Chen, H. I., Pinkas-Kramarski, R., Jaffe, E. A., Gandy, S. E., and Greengard, P. 1992. Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 10075-10078.
- Carpenter, S., Karpati, G., Heller, I., and Eisen, A. 1978. Inclusion body myositis: a distinct variety of idiopathic inflammatory myopathy. *Neurology* 28, 8-17.
- Chen, G. and Goeddel, D. V. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296, 1634-1635.
- Chiarugi, A. and Moskowitz, M. A. 2002. Cell biology. PARP-1--a perpetrator of apoptotic cell death? *Science* 297, 200-201.
- Cho, H. J., Kim, S. K., Jin, S. M., Hwang, E. M., Kim, Y. S., Huh, K., and Mook-Jung, I. 2007. IFN-gamma-induced BACE1 expression is mediated by activation of JAK2 and ERK1/2 signaling pathways and direct binding of STAT1 to BACE1 promoter in astrocytes. *Glia* 55, 253-262.

Choi, Y. C. and Dalakas, M. C. 2000. Expression of matrix metalloproteinases in the muscle of patients with inflammatory myopathies. *Neurology* 54, 65-71.

- Chou, S. M. 1967. Myxovirus-like structures in a case of human chronic polymyositis. *Science* 158, 1453-1455.
- Christensen, R. A., Shtifman, A., Allen, P. D., Lopez, J. R., and Querfurth, H. W. 2004. Calcium dyshomeostasis in beta-amyloid and tau-bearing skeletal myotubes. *J.Biol.Chem.* 279, 53524-53532.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George, H. P., and Selkoe, D. J. 1997. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat.Med.* 3, 67-72.
- Corces, V. G., Manso, R., De La, T. J., Avila, J., Nasr, A., and Wiche, G. 1980. Effects of DNA on microtubule assembly. *Eur. J. Biochem.* 105, 7-16.
- Cryns, V. and Yuan, J. 1998. Proteases to die for. Genes Dev. 12, 1551-1570.
- Cupler, E. J., Leon-Monzon, M., Miller, J., Semino-Mora, C., Anderson, T. L., and Dalakas, M. C. 1996. Inclusion body myositis in HIV-1 and HTLV-1 infected patients. *Brain* 119 (Pt 6), 1887-1893.
- Dalakas, M. C. 1998. Molecular immunology and genetics of inflammatory muscle diseases. *Arch.Neurol.* 55, 1509-1512.
- Dalakas, M. C. 2001. The molecular and cellular pathology of inflammatory muscle diseases. *Curr.Opin.Pharmacol.* 1, 300-306.
- Dalakas, M. C. 2004. Inflammatory disorders of muscle: progress in polymyositis, dermatomyositis and inclusion body myositis. *Curr.Opin.Neurol.* 17, 561-567.
- Dalakas, M. C. 2006a. Inflammatory, immune, and viral aspects of inclusion-body myositis. *Neurology* 66, S33-S38.
- Dalakas, M. C. 2006b. Sporadic inclusion body myositis--diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 437-447.
- Dalakas, M. C., Koffman, B., Fujii, M., Spector, S., Sivakumar, K., and Cupler, E. 2001. A controlled study of intravenous immunoglobulin combined with prednisone in the treatment of IBM. *Neurology* 56, 323-327.
- Dalakas, M. C., Sonies, B., Dambrosia, J., Sekul, E., Cupler, E., and Sivakumar, K. 1997. Treatment of inclusion-body myositis with IVIg: a double-blind, placebo-controlled study. *Neurology* 48, 712-716.
- Dau, P. C. 1987. Leukocytapheresis in inclusion body myositis. *J. Clin. Apher.* 3, 167-170.
- De Bleecker, J. L., De Paepe, B., Vanwalleghem, I. E., and Schroder, J. M. 2002. Differential expression of chemokines in inflammatory myopathies. *Neurology* 58, 1779-1785.

De Paepe, B., Racz, G. Z., Schroder, J. M., and De Bleecker, J. L. 2004. Expression and distribution of the nitric oxide synthases in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol.* 108, 37-42.

- De Strooper, B. and Annaert, W. 2000. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J.Cell Sci.* 113 (Pt 11), 1857-1870.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., and Kopan, R. 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387-390.
- Decary, S., Hamida, C. B., Mouly, V., Barbet, J. P., Hentati, F., and Butler-Browne, G. S. 2000. Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul.Disord.* 10, 113-120.
- Decary, S., Mouly, V., Hamida, C. B., Sautet, A., Barbet, J. P., and Butler-Browne, G. S. 1997. Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum.Gene Ther.* 8, 1429-1438.
- Delaunay, A., Bromberg, K. D., Hayashi, Y., Mirabella, M., Burch, D., Kirkwood, B., Serra, C., Malicdan, M. C., Mizisin, A. P., Morosetti, R., Broccolini, A., Guo, L. T., Jones, S. N., Lira, S. A., Puri, P. L., Shelton, G. D., and Ronai, Z. 2008. The ER-bound RING finger protein 5 (RNF5/RMA1) causes degenerative myopathy in transgenic mice and is deregulated in inclusion body myositis. *PLoS.ONE.* 3, e1609.
- Derham, B. K. and Harding, J. J. 1999. Alpha-crystallin as a molecular chaperone. *Prog.Retin.Eye Res.* 18, 463-509.
- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., and Simons, K. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J.Cell Biol.* 160, 113-123.
- Engel, A. G. and Arahata, K. 1984. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. II: Phenotypes of autoinvasive cells in polymyositis and inclusion body myositis. *Ann.Neurol.* 16, 209-215.
- Engel, W. K. and Askanas, V. 2006. Inclusion-body myositis: clinical, diagnostic, and pathologic aspects. *Neurology* 66, S20-S29.
- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P. J. 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.
- Feelisch, M., Rassaf, T., Mnaimneh, S., Singh, N., Bryan, N. S., Jourd'Heuil, D., and Kelm, M. 2002. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J.* 16, 1775-1785.

Fesik, S. W. and Shi, Y. 2001. Structural biology. Controlling the caspases. *Science* 294, 1477-1478.

- Figarella-Branger, D., Civatte, M., Bartoli, C., and Pellissier, J. F. 2003. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 28, 659-682.
- Forloni, G., Chiesa, R., Smiroldo, S., Verga, L., Salmona, M., Tagliavini, F., and Angeretti, N. 1993. Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35. *Neuroreport* 4, 523-526.
- Fratta, P., Engel, W. K., Van Leeuwen, F. W., Hol, E. M., Vattemi, G., and Askanas, V. 2004. Mutant ubiquitin UBB+1 is accumulated in sporadic inclusion-body myositis muscle fibers. *Neurology* 63, 1114-1117.
- Frey, C., Narayanan, K., McMillan, K., Spack, L., Gross, S. S., Masters, B. S., and Griffith, O. W. 1994. L-thiocitrulline. A stereospecific, heme-binding inhibitor of nitric-oxide synthases. *J.Biol.Chem.* 269, 26083-26091.
- Fukuchi, K., Pham, D., Hart, M., Li, L., and Lindsey, J. R. 1998. Amyloid-beta deposition in skeletal muscle of transgenic mice: possible model of inclusion body myopathy. *Am.J.Pathol.* 153, 1687-1693.
- Fyhr, I. M. and Oldfors, A. 1998. Upregulation of Fas/Fas ligand in inclusion body myositis. *Ann.Neurol.* 43, 127-130.
- Garvey, E. P., Oplinger, J. A., Furfine, E. S., Kiff, R. J., Laszlo, F., Whittle, B. J., and Knowles, R. G. 1997. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* 272, 4959-4963.
- Ghosh, A. K., Kumaragurubaran, N., Hong, L., Koelsh, G., and Tang, J. 2008. Memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors: drug development. *Curr.Alzheimer Res.* 5, 121-131.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., and Williams, P. M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6, 995-1001.
- Glabe, C. 2001. Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J.Mol.Neurosci.* 17, 137-145.
- Goebels, N., Michaelis, D., Engelhardt, M., Huber, S., Bender, A., Pongratz, D., Johnson, M. A., Wekerle, H., Tschopp, J., Jenne, D., and Hohlfeld, R. 1996. Differential expression of perforin in muscle-infiltrating T cells in polymyositis and dermatomyositis. *J.Clin.Invest* 97, 2905-2910.
- Goldgaber, D., Harris, H. W., Hla, T., Maciag, T., Donnelly, R. J., Jacobsen, J. S., Vitek, M. P., and Gajdusek, D. C. 1989. Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 7606-7610.
- Greenberg, S. A., Pinkus, G. S., Amato, A. A., and Pinkus, J. L. 2007. Myeloid dendritic cells in inclusion-body myositis and polymyositis. *Muscle Nerve* 35, 17-23.

Griffin, W. S. and Mrak, R. E. 2002. Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *J.Leukoc.Biol.* 72, 233-238.

- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J.Mol.Biol.* 166, 557-580.
- Hashimoto, M., Rockenstein, E., Crews, L., and Masliah, E. 2003. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular.Med.* 4, 21-36.
- He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 2509-2514.
- Hengstman, G. J., Brouwer, R., Egberts, W. T., Seelig, H. P., Jongen, P. J., van Venrooij, W. J., and van Engelen, B. G. 2002. Clinical and serological characteristics of 125 Dutch myositis patients. Myositis specific autoantibodies aid in the differential diagnosis of the idiopathic inflammatory myopathies. *J.Neurol.* 249, 69-75.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* 11, 1026-1030.
- Hong, H. S., Hwang, E. M., Sim, H. J., Cho, H. J., Boo, J. H., Oh, S. S., Kim, S. U., and Mook-Jung, I. 2003. Interferon gamma stimulates beta-secretase expression and sAPPbeta production in astrocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 307, 922-927.
- Hua, Q. and He, R. Q. 2002. Effect of phosphorylation and aggregation on tau binding to DNA. *Protein Pept.Lett.* 9, 349-357.
- Hua, Q. and He, R. Q. 2003. Tau could protect DNA double helix structure. *Biochim.Biophys.Acta* 1645, 205-211.
- Huey, K. A. and Meador, B. M. 2008. Contribution of IL-6 to the Hsp72, Hsp25, and alphabeta-crystallin responses to inflammation and exercise training in mouse skeletal and cardiac muscle. *J.Appl.Physiol* 105, 1830-1836.
- Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M., and Doms, R. W. 2000. Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J.Biol.Chem.* 275, 33729-33737.
- Hussain, I., Hawkins, J., Harrison, D., Hille, C., Wayne, G., Cutler, L., Buck, T., Walter, D., Demont, E., Howes, C., Naylor, A., Jeffrey, P., Gonzalez, M. I., Dingwall, C., Michel, A., Redshaw, S., and Davis, J. B. 2007. Oral administration of a potent and selective non-peptidic BACE-1 inhibitor decreases beta-cleavage of amyloid precursor protein and amyloid-beta production in vivo. *J.Neurochem.* 100, 802-809.
- Inukai, A., Kobayashi, Y., Ito, K., Doyu, M., Takano, A., Honda, H., and Sobue, G. 1997. Expression of Fas antigen is not associated with apoptosis in human myopathies. *Muscle Nerve* 20, 702-709.

Jakoby, W. B. and Pastand, I. H. Methods in Enzymology Volume LVIII: Cell Culture, Academic PRess, Inc. NY. 1979.

- Ref Type: Generic
- Jin, L. W., Hearn, M. G., Ogburn, C. E., Dang, N., Nochlin, D., Ladiges, W. C., and Martin, G. M. 1998. Transgenic mice over-expressing the C-99 fragment of betaPP with an alpha-secretase site mutation develop a myopathy similar to human inclusion body myositis. *Am.J.Pathol.* 153, 1679-1686.
- Jin, L. W., Ninomiya, H., Roch, J. M., Schubert, D., Masliah, E., Otero, D. A., and Saitoh, T. 1994. Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J.Neurosci.* 14, 5461-5470.
- Jung, S. S., Nalbantoglu, J., and Cashman, N. R. 1996. Alzheimer's beta-amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex vivo brain cells: a flow cytometric study. *J.Neurosci.Res.* 46, 336-348.
- Karpati, G., Pouliot, Y., and Carpenter, S. 1988. Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. *Ann.Neurol.* 23, 64-72.
- Keck, S., Nitsch, R., Grune, T., and Ullrich, O. 2003. Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J.Neurochem.* 85, 115-122.
- Kelly, J. J., Jr., Madoc-Jones, H., Adelman, L. S., Andres, P. L., and Munsat, T. L. 1986. Total body irradiation not effective in inclusion body myositis. *Neurology* 36, 1264-1266.
- Kerr, J. F. 1965. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J.Pathol.Bacteriol.* 90, 419-435.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26, 239-257.
- Kilbourn, R. G., Jubran, A., Gross, S. S., Griffith, O. W., Levi, R., Adams, J., and Lodato, R. F. 1990. Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 172, 1132-1138.
- Kitazawa, M., Green, K. N., Caccamo, A., and LaFerla, F. M. 2006. Genetically augmenting Abeta42 levels in skeletal muscle exacerbates inclusion body myositis-like pathology and motor deficits in transgenic mice. *Am.J.Pathol.* 168, 1986-1997.
- Koo, E. H. and Squazzo, S. L. 1994. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J.Biol.Chem.* 269, 17386-17389.
- Koo, E. H., Squazzo, S. L., Selkoe, D. J., and Koo, C. H. 1996. Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J.Cell Sci.* 109 (Pt 5), 991-998.

Kuentzel, S. L., Ali, S. M., Altman, R. A., Greenberg, B. D., and Raub, T. J. 1993. The Alzheimer beta-amyloid protein precursor/protease nexin-II is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells. *Biochem.J.* 295 (Pt 2), 367-378.

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LaFerla, F. M., Green, K. N., and Oddo, S. 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat.Rev.Neurosci.* 8, 499-509.
- Lam, Y. A., Pickart, C. M., Alban, A., Landon, M., Jamieson, C., Ramage, R., Mayer, R. J., and Layfield, R. 2000. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 9902-9906.
- Lee, E. K., Park, Y. W., Shin, D. Y., Mook-Jung, I., and Yoo, Y. J. 2006. Cytosolic amyloid-beta peptide 42 escaping from degradation induces cell death. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 344, 471-477.
- Li, Y., Zhou, W., Tong, Y., He, G., and Song, W. 2006. Control of APP processing and Abeta generation level by BACE1 enzymatic activity and transcription. *FASEB J.* 20, 285-292.
- Li, Y. P., Bushnell, A. F., Lee, C. M., Perlmutter, L. S., and Wong, S. K. 1996. Betaamyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. *Brain Res.* 738, 196-204.
- Li, Y. P., Chen, Y., John, J., Moylan, J., Jin, B., Mann, D. L., and Reid, M. B. 2005. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J.* 19, 362-370.
- Lindersson, E., Beedholm, R., Hojrup, P., Moos, T., Gai, W., Hendil, K. B., and Jensen, P. H. 2004. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J.Biol.Chem.* 279, 12924-12934.
- Lopez, S. M., Pasquini, L., Besio, M. M., Pasquini, J. M., and Soto, E. 2003. Relationship between beta-amyloid degradation and the 26S proteasome in neural cells. *Exp.Neurol.* 180, 131-143.
- Lorenzo, A., Yuan, M., Zhang, Z., Paganetti, P. A., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Mautino, J., Vigo, F. S., Sommer, B., and Yankner, B. A. 2000. Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat.Neurosci.* 3, 460-464.
- Lotz, B. P., Engel, A. G., Nishino, H., Stevens, J. C., and Litchy, W. J. 1989. Inclusion body myositis. Observations in 40 patients. *Brain* 112 (Pt 3), 727-747.
- Lowe, J., Mayer, R. J., and Landon, M. 1993. Ubiquitin in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol.* 3, 55-65.
- Lu, D. C., Shaked, G. M., Masliah, E., Bredesen, D. E., and Koo, E. H. 2003. Amyloid beta protein toxicity mediated by the formation of amyloid-beta protein precursor complexes. *Ann.Neurol.* 54, 781-789.

Lundberg, I., Brengman, J. M., and Engel, A. G. 1995. Analysis of cytokine expression in muscle in inflammatory myopathies, Duchenne dystrophy, and non-weak controls. *J.Neuroimmunol.* 63, 9-16.

- Lundberg, I., Ulfgren, A. K., Nyberg, P., Andersson, U., and Klareskog, L. 1997. Cytokine production in muscle tissue of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum.* 40, 865-874.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J. C., Yan, Q., Richards, W. G., Citron, M., and Vassar, R. 2001. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat.Neurosci.* 4, 231-232.
- Mampuru, L. J., Chen, S. J., Kalenik, J. L., Bradley, M. E., and Lee, T. C. 1996. Analysis of events associated with serum deprivation-induced apoptosis in C3H/Sol8 muscle satellite cells. *Exp. Cell Res.* 226, 372-380.
- Mastaglia, F. L., Garlepp, M. J., Phillips, B. A., and Zilko, P. J. 2003. Inflammatory myopathies: clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Muscle Nerve* 27, 407-425.
- McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F., and Wahl, S. M. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J.Exp.Med.* 178, 749-754.
- McConlogue, L., Buttini, M., Anderson, J. P., Brigham, E. F., Chen, K. S., Freedman, S. B., Games, D., Johnson-Wood, K., Lee, M., Zeller, M., Liu, W., Motter, R., and Sinha, S. 2007. Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *J.Biol.Chem.* 282, 26326-26334.
- McFerrin, J., Engel, W. K., and Askanas, V. 1999. Cultured inclusion-body myositis muscle fibers do not accumulate beta-amyloid precursor protein and can be innervated. *Neurology* 53, 2184-2187.
- McGeer, P. L., Akiyama, H., Kawamata, T., Yamada, T., Walker, D. G., and Ishii, T. 1992. Immunohistochemical localization of beta-amyloid precursor protein sequences in Alzheimer and normal brain tissue by light and electron microscopy. *J.Neurosci.Res.* 31, 428-442.
- Mendell, J. R., Sahenk, Z., Gales, T., and Paul, L. 1991. Amyloid filaments in inclusion body myositis. Novel findings provide insight into nature of filaments. *Arch.Neurol.* 48, 1229-1234.
- Michaelis, D., Goebels, N., and Hohlfeld, R. 1993. Constitutive and cytokine-induced expression of human leukocyte antigens and cell adhesion molecules by human myotubes. *Am.J.Pathol.* 143, 1142-1149.
- Migheli, A., Mongini, T., Doriguzzi, C., Chiado-Piat, L., Piva, R., Ugo, I., and Palmucci, L. 1997. Muscle apoptosis in humans occurs in normal and denervated muscle, but not in myotonic dystrophy, dystrophinopathies or inflammatory disease. *Neurogenetics.* 1, 81-87.
- Mirabella, M., Alvarez, R. B., Bilak, M., Engel, W. K., and Askanas, V. 1996a.

 Difference in expression of phosphorylated tau epitopes between sporadic

- inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 55, 774-786.
- Mirabella, M., Alvarez, R. B., Engel, W. K., Weisgraber, K. H., and Askanas, V. 1996b. Apolipoprotein E and apolipoprotein E messenger RNA in muscle of inclusion body myositis and myopathies. *Ann.Neurol.* 40, 864-872.
- Monning, U., Sandbrink, R., Weidemann, A., Banati, R. B., Masters, C. L., and Beyreuther, K. 1995. Extracellular matrix influences the biogenesis of amyloid precursor protein in microglial cells. *J.Biol.Chem.* 270, 7104-7110.
- Morosetti, R., Broccolini, A., Sancricca, C., Gliubizzi, C., Gidaro, T., Tonali, P. A., Ricci, E., and Mirabella, M. 2008. Increased aging in primary muscle cultures of sporadic inclusion-body myositis. *Neurobiol.Aging*.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Muntzing, K., Lindberg, C., Moslemi, A. R., and Oldfors, A. 2003. Inclusion body myositis: clonal expansions of muscle-infiltrating T cells persist over time. *Scand.J.Immunol.* 58, 195-200.
- Murata, K. and Dalakas, M. C. 2000. Expression of the co-stimulatory molecule BB-1, the ligands CTLA-4 and CD28 and their mRNAs in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain* 123 (Pt 8), 1660-1666.
- Nagaraju, K. 2001. Immunological capabilities of skeletal muscle cells. *Acta Physiol Scand.* 171, 215-223.
- Nagaraju, K., Casciola-Rosen, L., Rosen, A., Thompson, C., Loeffler, L., Parker, T., Danning, C., Rochon, P. J., Gillespie, J., and Plotz, P. 2000. The inhibition of apoptosis in myositis and in normal muscle cells. *J.Immunol.* 164, 5459-5465.
- Nagaraju, K., Raben, N., Merritt, G., Loeffler, L., Kirk, K., and Plotz, P. 1998. A variety of cytokines and immunologically relevant surface molecules are expressed by normal human skeletal muscle cells under proinflammatory stimuli. *Clin.Exp.Immunol.* 113, 407-414.
- Ninomiya, H., Roch, J. M., Sundsmo, M. P., Otero, D. A., and Saitoh, T. 1993. Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid beta/A4 protein precursor that promotes fibroblast growth. *J.Cell Biol.* 121, 879-886.
- Nishimura, I., Uetsuki, T., Dani, S. U., Ohsawa, Y., Saito, I., Okamura, H., Uchiyama, Y., and Yoshikawa, K. 1998. Degeneration in vivo of rat hippocampal neurons by wild-type Alzheimer amyloid precursor protein overexpressed by adenovirus-mediated gene transfer. *J.Neurosci.* 18, 2387-2398.
- Niwa, M., Sidrauski, C., Kaufman, R. J., and Walter, P. 1999. A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response. *Cell* 99, 691-702.
- Ohyagi, Y. 2008. Intracellular amyloid beta-protein as a therapeutic target for treating Alzheimer's disease. *Curr.Alzheimer Res.* 5, 555-561.

Oldfors, A., Moslemi, A. R., Jonasson, L., Ohlsson, M., Kollberg, G., and Lindberg, C. 2006. Mitochondrial abnormalities in inclusion-body myositis. *Neurology* 66, S49-S55.

- Olive, M. and Ferrer, I. 1999. Bcl-2 and Bax protein expression in human myopathies. *J.Neurol.Sci.* 164, 76-81.
- Olive, M., Martinez-Matos, J. A., Montero, J., and Ferrer, I. 1997. Apoptosis is not the mechanism of cell death of muscle fibers in human muscular dystrophies and inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 20, 1328-1330.
- Ostermann, J., Horwich, A. L., Neupert, W., and Hartl, F. U. 1989. Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature* 341, 125-130.
- Ozden, S., Gessain, A., Gout, O., and Mikol, J. 2001. Sporadic inclusion body myositis in a patient with human T cell leukemia virus type 1-associated myelopathy. *Clin.Infect.Dis.* 32, 510-514.
- Paciello, O., Wojcik, S., Engel, W. K., McFerrin, J., and Askanas, V. 2006. Parkin and its association with alpha-synuclein and AbetaPP in inclusion-body myositis and AbetaPP-overexpressing cultured human muscle fibers. *Acta Myol.* 25, 13-22.
- Papasozomenos, S. C. 1995. Nuclear tau immunoreactivity in presenile dementia with motor neuron disease: a case report. *Clin.Neuropathol.* 14, 100-104.
- Park, C. S., Park, R., and Krishna, G. 1996. Constitutive expression and structural diversity of inducible isoform of nitric oxide synthase in human tissues. *Life Sci.* 59, 219-225.
- Peng, A., Koffman, B. M., Malley, J. D., and Dalakas, M. C. 2000. Disease progression in sporadic inclusion body myositis: observations in 78 patients. *Neurology* 55, 296-298.
- Perez, R. G., Soriano, S., Hayes, J. D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D. J., Chen, X., Stokin, G. B., and Koo, E. H. 1999. Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J.Biol.Chem.* 274, 18851-18856.
- Petersen, R. and Lindquist, S. 1988. The Drosophila hsp70 message is rapidly degraded at normal temperatures and stabilized by heat shock. *Gene* 72, 161-168.
- Phillips, B. A., Zilko, P. J., and Mastaglia, F. L. 2000. Prevalence of sporadic inclusion body myositis in Western Australia. *Muscle Nerve* 23, 970-972.
- Pizza, F. X., Hernandez, I. J., and Tidball, J. G. 1998. Nitric oxide synthase inhibition reduces muscle inflammation and necrosis in modified muscle use. *J.Leukoc.Biol.* 64, 427-433.
- Popov, S. G., Villasmil, R., Bernardi, J., Grene, E., Cardwell, J., Wu, A., Alibek, D., Bailey, C., and Alibek, K. 2002. Lethal toxin of Bacillus anthracis causes apoptosis of macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 293, 349-355.

Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H. A., and Herms, J. 2006. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J.Neurosci.* 26, 7212-7221.

- Pruitt, J. N., Showalter, C. J., and Engel, A. G. 1996. Sporadic inclusion body myositis: counts of different types of abnormal fibers. *Ann.Neurol.* 39, 139-143.
- Querfurth, H. W., Suhara, T., Rosen, K. M., McPhie, D. L., Fujio, Y., Tejada, G., Neve, R. L., Adelman, L. S., and Walsh, K. 2001. Beta-amyloid peptide expression is sufficient for myotube death: implications for human inclusion body myopathy. *Mol.Cell Neurosci.* 17, 793-810.
- Raju, R. and Dalakas, M. C. 2005. Gene expression profile in the muscles of patients with inflammatory myopathies: effect of therapy with IVIg and biological validation of clinically relevant genes. *Brain* 128, 1887-1896.
- Raju, R., Vasconcelos, O., Granger, R., and Dalakas, M. C. 2003. Expression of IFN-gamma-inducible chemokines in inclusion body myositis. *J.Neuroimmunol.* 141, 125-131.
- Rehfeldt, C., Renne, U., Wittstock, M., Mix, E., and Zettl, U. K. 2004. Long-term growth selection of mice changes the intrinsic susceptibility of myogenic cells to apoptosis. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 25, 177-185.
- Reinhard, C., Hebert, S. S., and De Strooper, B. 2005. The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J.* 24, 3996-4006.
- Riddell, D. R., Christie, G., Hussain, I., and Dingwall, C. 2001. Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr.Biol.* 11, 1288-1293.
- Roberds, S. L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M. J., Branstetter, D. G., Chen, K. S., Freedman, S. B., Frigon, N. L., Games, D., Hu, K., Johnson-Wood, K., Kappenman, K. E., Kawabe, T. T., Kola, I., Kuehn, R., Lee, M., Liu, W., Motter, R., Nichols, N. F., Power, M., Robertson, D. W., Schenk, D., Schoor, M., Shopp, G. M., Shuck, M. E., Sinha, S., Svensson, K. A., Tatsuno, G., Tintrup, H., Wijsman, J., Wright, S., and McConlogue, L. 2001. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum.Mol.Genet.* 10, 1317-1324.
- Rogers, J. T., Leiter, L. M., McPhee, J., Cahill, C. M., Zhan, S. S., Potter, H., and Nilsson, L. N. 1999. Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *J.Biol.Chem.* 274, 6421-6431.
- Roy, R., Dansereau, G., Tremblay, J. P., Belles-Isles, M., Huard, J., Labrecque, C., and Bouchard, J. P. 1991. Expression of major histocompatibility complex antigens on human myoblasts. *Transplant.Proc.* 23, 799-801.
- Sambamurti, K., Shioi, J., Anderson, J. P., Pappolla, M. A., and Robakis, N. K. 1992. Evidence for intracellular cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor in PC12 cells. *J.Neurosci.Res.* 33, 319-329.
- Sarkozi, E., Askanas, V., Johnson, S. A., Engel, W. K., and Alvarez, R. B. 1993. beta-Amyloid precursor protein mRNA is increased in inclusion-body myositis muscle. *Neuroreport* 4, 815-818.

- Schagger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. Nat. Protoc. 1, 16-22.
- Schmidt, J., Barthel, K., Wrede, A., Salajegheh, M., Bahr, M., and Dalakas, M. C. 2008. Interrelation of inflammation and APP in sIBM: IL-1 beta induces accumulation of beta-amyloid in skeletal muscle. *Brain* 131, 1228-1240.
- Schmidt, J., Rakocevic, G., Raju, R., and Dalakas, M. C. 2004. Upregulated inducible co-stimulator (ICOS) and ICOS-ligand in inclusion body myositis muscle: significance for CD8+ T cell cytotoxicity. *Brain* 127, 1182-1190.
- Schneider, C., Gold, R., Dalakas, M. C., Schmied, M., Lassmann, H., Toyka, K. V., and Hartung, H. P. 1996. MHC class I-mediated cytotoxicity does not induce apoptosis in muscle fibers nor in inflammatory T cells: studies in patients with polymyositis, dermatomyositis, and inclusion body myositis.

 J.Neuropathol.Exp.Neurol. 55, 1205-1209.
- Schroder, J. M. and Molnar, M. 1997. Mitochondrial abnormalities and peripheral neuropathy in inflammatory myopathy, especially inclusion body myositis. *Mol.Cell Biochem.* 174, 277-281.
- Selkoe, D. J. 1994. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu.Rev.Neurosci.* 17, 489-517.
- Selkoe, D. J. 2004. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat. Cell Biol.* 6, 1054-1061.
- Shamim, E. A., Rider, L. G., Pandey, J. P., O'Hanlon, T. P., Jara, L. J., Samayoa, E. A., Burgos-Vargas, R., Vazquez-Mellado, J., Alcocer-Varela, J., Salazar-Paramo, M., Kutzbach, A. G., Malley, J. D., Targoff, I. N., Garcia-De la Torre, I., and Miller, F. W. 2002. Differences in idiopathic inflammatory myopathy phenotypes and genotypes between Mesoamerican Mestizos and North American Caucasians: ethnogeographic influences in the genetics and clinical expression of myositis. *Arthritis Rheum.* 46, 1885-1893.
- Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J., and Tonegawa, S. 1997. Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89, 629-639.
- Shi, X. and Garry, D. J. 2006. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 20, 1692-1708.
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G., and Simons, K. 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 6460-6464.
- Singer, O., Marr, R. A., Rockenstein, E., Crews, L., Coufal, N. G., Gage, F. H., Verma, I. M., and Masliah, E. 2005. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat.Neurosci.* 8, 1343-1349.
- Sisodia, S. S. and George-Hyslop, P. H. 2002. gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat.Rev.Neurosci.* 3, 281-290.
- Sondag, C. M. and Combs, C. K. 2004. Amyloid precursor protein mediates proinflammatory activation of monocytic lineage cells. *J.Biol.Chem.* 279, 14456-14463.

Sondag, C. M. and Combs, C. K. 2006. Amyloid precursor protein cross-linking stimulates beta amyloid production and pro-inflammatory cytokine release in monocytic lineage cells. *J.Neurochem.* 97, 449-461.

- Song, W., Nadeau, P., Yuan, M., Yang, X., Shen, J., and Yankner, B. A. 1999. Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 6959-6963.
- Stangel, M., Zettl, U. K., Mix, E., Zielasek, J., Toyka, K. V., Hartung, H. P., and Gold, R. 1996. H2O2 and nitric oxide-mediated oxidative stress induce apoptosis in rat skeletal muscle myoblasts. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 55, 36-43.
- Stewart, C. E. and Rotwein, P. 1996. Insulin-like growth factor-II is an autocrine survival factor for differentiating myoblasts. *J.Biol.Chem.* 271, 11330-11338.
- Sugarman, M. C., Kitazawa, M., Baker, M., Caiozzo, V. J., Querfurth, H. W., and LaFerla, F. M. 2006. Pathogenic accumulation of APP in fast twitch muscle of IBM patients and a transgenic model. *Neurobiol.Aging* 27, 423-432.
- Talanian, R. V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M. C., Mankovich, J. A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K. D., and Wong, W. W. 1997. Substrate specificities of caspase family proteases. *J.Biol.Chem.* 272, 9677-9682.
- Tamir, S., deRojas-Walker, T., Gal, A., Weller, A. H., Li, X., Fox, J. G., Wogan, G. N., and Tannenbaum, S. R. 1995. Nitric oxide production in relation to spontaneous B-cell lymphoma and myositis in SJL mice. *Cancer Res.* 55, 4391-4397.
- Tateyama, M., Fujihara, K., Misu, T., and Itoyama, Y. 2009. CCR7+ myeloid dendritic cells together with CCR7+ T cells and CCR7+ macrophages invade CCL19+ nonnecrotic muscle fibers in inclusion body myositis. *J.Neurol.Sci.*
- Tateyama, M., Takeda, A., Onodera, Y., Matsuzaki, M., Hasegawa, T., Nunomura, A., Hirai, K., Perry, G., Smith, M. A., and Itoyama, Y. 2003. Oxidative stress and predominant Abeta42(43) deposition in myopathies with rimmed vacuoles. *Acta Neuropathol.* 105, 581-585.
- Temiz, P., Weihl, C. C., and Pestronk, A. 2008. Inflammatory myopathies with mitochondrial pathology and protein aggregates. *J.Neurol.Sci.*
- Tews, D. S. and Goebel, H. H. 1996a. Cytokine expression profile in idiopathic inflammatory myopathies. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 55, 342-347.
- Tews, D. S. and Goebel, H. H. 1996b. DNA fragmentation and BCL-2 expression in infantile spinal muscular atrophy. *Neuromuscul.Disord.* 6, 265-273.
- Tews, D. S. and Goebel, H. H. 1997. DNA-fragmentation and expression of apoptosisrelated proteins in muscular dystrophies. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 23, 331-338.
- Tews, D. S. and Goebel, H. H. 1998. Cell death and oxidative damage in inflammatory myopathies. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 87, 240-247.
- Town, T., Laouar, Y., Pittenger, C., Mori, T., Szekely, C. A., Tan, J., Duman, R. S., and Flavell, R. A. 2008. Blocking TGF-beta-Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nat.Med.* 14, 681-687.

Vattemi, G., Engel, W. K., McFerrin, J., Buxbaum, J. D., Pastorino, L., and Askanas, V. 2001. Presence of BACE1 and BACE2 in muscle fibres of patients with sporadic inclusion-body myositis. *Lancet* 358, 1962-1964.

- Vattemi, G., Engel, W. K., McFerrin, J., Pastorino, L., Buxbaum, J. D., and Askanas, V. 2003. BACE1 and BACE2 in pathologic and normal human muscle. *Exp.Neurol.* 179, 150-158.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J.Immunol.Methods* 184, 39-51.
- Vetrivel, K. S. and Thinakaran, G. 2006. Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* 66, S69-S73.
- Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635-1636.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., and Selkoe, D. J. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535-539.
- Walter, M. C., Lochmuller, H., Toepfer, M., Schlotter, B., Reilich, P., Schroder, M., Muller-Felber, W., and Pongratz, D. 2000. High-dose immunoglobulin therapy in sporadic inclusion body myositis: a double-blind, placebo-controlled study. *J.Neurol.* 247, 22-28.
- Wanchu, A., Khullar, M., Sud, A., and Bambery, P. 1999. Nitric oxide production is increased in patients with inflammatory myositis. *Nitric.Oxide.* 3, 454-458.
- Wang, J., Guo, K., Wills, K. N., and Walsh, K. 1997. Rb functions to inhibit apoptosis during myocyte differentiation. *Cancer Res.* 57, 351-354.
- Wang, J. and Walsh, K. 1996. Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science* 273, 359-361.
- Wang, Y. and Ha, Y. 2004. The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol.Cell* 15, 343-353.
- Weil, M., Jacobson, M. D., Coles, H. S., Davies, T. J., Gardner, R. L., Raff, K. D., and Raff, M. C. 1996. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J.Cell Biol.* 133, 1053-1059.
- Welch, W. J. 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev.* 72, 1063-1081.
- Wessel, D. and Flugge, U. I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal.Biochem.* 138, 141-143.
- Wiendl, H., Hohlfeld, R., and Kieseier, B. C. 2005. Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. *Trends Immunol.* 26, 373-380.

Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Melms, A., Lochmuller, H., Hohlfeld, R., and Weller, M. 2003. Muscle fibres and cultured muscle cells express the B7.1/2-related inducible co-stimulatory molecule, ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain* 126, 1026-1035.

- Williams, G., Brown, T., Becker, L., Prager, M., and Giroir, B. P. 1994. Cytokine-induced expression of nitric oxide synthase in C2C12 skeletal muscle myocytes. Am.J.Physiol 267, R1020-R1025.
- Wittstock, M., Rehfeldt, C., Nurnberg, G., Renne, U., Bruck, W., Mix, E., and Zettl, U. K. 2003. Susceptibility to apoptosis in different murine muscle cell lines. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 24, 521-526.
- Wojcik, S., Engel, W. K., McFerrin, J., Paciello, O., and Askanas, V. 2006. AbetaPP-overexpression and proteasome inhibition increase alphaB-crystallin in cultured human muscle: relevance to inclusion-body myositis. *Neuromuscul.Disord.* 16, 839-844.
- Wright, W. E. and Shay, J. W. 2002. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat.Biotechnol.* 20, 682-688.
- Wu, C. H., Caspar, T., Browse, J., Lindquist, S., and Somerville, C. 1988. Characterization of an HSP70 Cognate Gene Family in Arabidopsis. *Plant Physiol* 88, 731-740.
- Yang, A. J., Chandswangbhuvana, D., Margol, L., and Glabe, C. G. 1998a. Loss of endosomal/lysosomal membrane impermeability is an early event in amyloid Abeta1-42 pathogenesis. *J.Neurosci.Res.* 52, 691-698.
- Yang, A. J., Knauer, M., Burdick, D. A., and Glabe, C. 1995. Intracellular A beta 1-42 aggregates stimulate the accumulation of stable, insoluble amyloidogenic fragments of the amyloid precursor protein in transfected cells. *J.Biol.Chem.* 270, 14786-14792.
- Yang, C. C., Alvarez, R. B., Engel, W. K., and Askanas, V. 1996. Increase of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in inclusion-body myositis. *Neuroreport* 8, 153-158.
- Yang, C. C., Alvarez, R. B., Engel, W. K., Heller, S. L., and Askanas, V. 1998b. Nitric oxide-induced oxidative stress in autosomal recessive and dominant inclusionbody myopathies. *Brain* 121 (Pt 6), 1089-1097.
- Yunis, E. J. and Samaha, F. J. 1971. Inclusion body myositis. Lab Invest 25, 240-248.
- Zhang, Z., Nadeau, P., Song, W., Donoviel, D., Yuan, M., Bernstein, A., and Yankner, B. A. 2000. Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat.Cell Biol.* 2, 463-465.
- Zheng, H. and Koo, E. H. 2006. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol.Neurodegener.* 1, 5.
- Zheng, L., Kagedal, K., Dehvari, N., Benedikz, E., Cowburn, R., Marcusson, J., and Terman, A. 2009. Oxidative stress induces macroautophagy of amyloid betaprotein and ensuing apoptosis. *Free Radic.Biol.Med.* 46, 422-429.

Danksagung 147

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. S. Hoyer-Fender für die Erstbetreuung meiner Doktorarbeit sowie für ihre Bereitschaft, mir mit konstruktiven Ratschlägen zur Seite zu stehen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Doenecke für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Jens Schmidt danke ich ganz besonders für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Abteilung für klinische und experimentelle Neuroimmunologie anfertigen zu können, für das Überlassen des interessanten Themas und für die fachliche Unterstützung während der Arbeit.

Ein besonders herzliches Dankeschön gilt Frau Nicole Tasch, die mich nicht nur methodisch tatkräftig unterstütze, sondern mir auch privat jeder Zeit zur Seite stand.

Auch bei Ingrid Muth möchte ich mich für diese überaus humorvolle Zusammenarbeit der letzten Jahre bedanken, die eine große Bereicherung für den oftmals anstrengenden Laboralltag war.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des IMSF und der AG Schmidt, die mich sehr freundlich aufgenommen haben. Die überaus sympathische Arbeitsatmosphäre, sowie die aufmunternden Gespräche haben zum sehr angenehmen Arbeiten beigetragen.

Ebenfalls danke ich allen Teilnehmern der Doktorandenabende für den Gedankenaustausch der etwas anderen Art.

Meinem Freund Christoph danke ich ganz besonders für sein Verständnis und Rückhalt, für die fachlichen Ratschläge und sein konstruktives Korrekturlesen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern ganz herzlich bedanken, die mein gesamtes Studium und meine Promotion mit großem Interesse verfolgten und mir jederzeit unterstützend zur Seite standen.