

Aus der Abteilung Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Expression von *High Mobility Group Box 1* (HMGB1)
und dessen *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE)
als Pathomechanismus der sporadischen Einschlusskörpermyositis

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von
Ingrid Elisabeth Muth
aus Duderstadt

Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I.Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Bähr

II.Berichterstatter/in:

III. Berichtersteller/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Meinem Großvater

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Sporadische Einschlusskörpermyositis.....	1
1.1.1	Einführung.....	1
1.1.2	Epidemiologie, Symptomatik und Verlauf.....	1
1.1.3	Histopathologie und Pathophysiologie.....	2
1.1.4	Diagnostik und Therapie.....	4
1.2	High Mobility Group Box 1 (HMGB1) und dessen Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE).....	5
1.2.1	Einführung.....	5
1.2.2	Aufbau von HMGB1.....	5
1.2.3	Zelluläre Expression und Freisetzung von HMGB1.....	6
1.2.4	Funktion von HMGB1.....	6
1.2.5	Rezeptoren von HMGB1.....	7
1.2.6	Struktur und Liganden von RAGE sowie Signaltransduktion.....	8
1.2.7	Klinische Syndrome, die mit HMGB1 und RAGE assoziiert sind.....	8
2	Ziele dieser Arbeit.....	10
3	Material und Methoden.....	11
3.1	Zellbiologische Methoden und Materialien.....	11
3.1.1	Einführung.....	11
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität und Kultivierung von CCL136 auf 24-Kammer-Platten/8-Kammer-Objektträger.....	11
3.1.3	Zytokin-Exposition und HMGB1-Inhibition von Zellkulturen auf 24-Kammer-Platten/8-Kammer-Objektträgern.....	12
3.1.4	Fixierung von 8-Kammer-Objektträgern/Gefrierschnitten.....	12
3.2	Immunbiologische Methoden und Materialien.....	12

3.2.1	Patienten und Kontrollen - Muskelbiopsate	12
3.2.2	Hämalaun und Eosin-Färbung von Kryoschnitten	13
3.2.3	Trichrom-Färbung nach Gomori	13
3.2.4	Immunzytochemische/immunhistochemische Färbungen.....	13
3.2.5	ThioflavinS-Färbung	14
3.2.6	Propidiumiodid-Färbung	14
3.2.7	Fluoreszenz-mikroskopische Analyse	14
3.2.8	Durchflusszytometrie (fluorescent activating cell sorting; FACS)	15
3.2.9	Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für HMGB1 ..	15
3.3	Molekularbiologische Methoden und Materialien	15
3.3.1	RNA-Extraktion aus Gewebe/Zellkultur (24-Kammer-Platte).....	15
3.3.2	cDNA-Synthese	16
3.3.3	Real-time-Polymerase-Kettenreaktion	16
3.4	Statistische Methoden	17
4	Ergebnisse.....	18
4.1	Interaktion von degenerativen, entzündlichen und Zellstress-assoziierten Markern im Skelettmuskel der sIBM.....	18
4.1.1	Quantitative Analyse seriell gefärbter sIBM-Gefrierschnitte für Degenerations-/Regenerations-, Zellstress- und Entzündungs-Marker	18
4.1.2	Assoziation zwischen α B-Crystallin und Degenerations-Markern	20
4.1.3	Expression von α B-Crystallin in normal erscheinenden Muskelfasern.....	22
4.1.4	Pathologische Veränderungen assoziiert mit β -Amyloid	24
4.2	Expression von HMGB1 und RAGE im Skelettmuskel der sIBM	24
4.2.1	Quantifizierung der Expression von HMGB1 und RAGE auf mRNA- und Proteinebene im Gewebe von sIBM-Patienten im Vergleich zu nicht-myopathischen Kontrollen	25

4.2.2	Assoziation von HMGB1 und RAGE mit β -Amyloid und P-Tau.....	27
4.3	Expression von HMGB1 und RAGE in Muskelzellen unter pro- inflammatorischem Zellstress	28
4.3.1	mRNA-Expression von HMGB1 und RAGE nach Zytokin-induziertem Zellstress	29
4.3.2	Translokation und Überexpression von HMGB1 nach Zytokin-induziertem Zellstress auf Proteinebene	29
4.3.3	Sekretion von HMGB1 nach Zytokin-induziertem Zellstress.....	30
4.3.4	Hochregulation von RAGE nach Zytokin-induziertem Zellstress.....	31
4.3.5	Zunahme von Amyloid-Aggregation und Zelltod nach Exposition zu pro- inflammatorischen Zytokinen.....	32
4.3.6	Reduktion der Zytokin-induzierten Amyloid-Aggregatbildung durch den HMGB1-Inhibitor Box A.....	33
5	Diskussion	35
5.1	α B-Crystallin und APP als frühe pathogenetische Marker der sIBM	35
5.2	Expression von HMGB1 und RAGE im Skelettmuskel der sIBM	37
5.3	Interaktionen von pro-inflammatorischem Zellstress, der Expression von HMGB1 und RAGE und der Akkumulation von Amyloid in Muskelzellen.....	38
6	Zusammenfassung	41
7	Literaturverzeichnis.....	42

Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminoactinomycin
Ac	Aceton
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	Durchflusszytometrie
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HMGB1	<i>high mobility group box 1</i>
HSP	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
Meth	Methanol
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MW	Mittelwert
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
P-Tau	phosphoryliertes Tau/Neurofilament
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
RT-PCR	<i>real time</i> -Polymerasekettenreaktion
Rox	Carboxy-X-Rhodamin
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
sIBM	sporadische Einschlusskörpermyositis
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

1 Einleitung

1.1 Sporadische Einschlusskörpermyositis

1.1.1 Einführung

Die Einschlusskörpermyositis (*Inclusion Body Myositis; IBM*) zählt zu der Gruppe der entzündlichen Muskelerkrankungen. Der Begriff „*Inclusion Body Myositis*“ wurde 1971 geprägt [Yunis und Samaha 1971]. Allerdings wurden bereits 1967 im Muskelgewebe eines Patienten mit Polymyositis IBM-ähnliche Veränderungen bei passender Klinik beschrieben [Chou 1967]. Neben einer sporadischen Form (sIBM) findet sich auch eine hereditäre Variante (hIBM), bei der es sich um eine nicht-entzündliche Muskelerkrankung handelt [Mitrani-Rosenbaum *et al.* 1996]. Im Zentrum der vorliegenden Dissertation steht die sIBM.

1.1.2 Epidemiologie, Symptomatik und Verlauf

Die Prävalenz der sIBM wird auf 4,3 bis 14,9 pro Million geschätzt. Bei Patienten älter als 50 Jahre steigt sie jedoch auf bis zu 51,3 pro Million an. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt um das 55. Lebensjahr, es gibt aber auch Fälle in denen sich die Erkrankung um das 30. oder das 80. Lebensjahr manifestiert. Etwa dreiviertel der Betroffenen sind männlich [Badrising *et al.* 2000; Needham *et al.* 2008].

Die sIBM ist eine chronisch progressive, entzündliche Muskelerkrankung, die zu Muskelschwäche und Atrophie distaler und proximaler Muskeln führt. Initial sind häufig der Quadrizeps sowie die tiefen Fingerbeuger beteiligt (Abb. 1-1), wodurch Patienten sehr leicht stürzen und feinmotorische Tätigkeiten nicht mehr ausführen können. Im Verlauf nimmt die Muskelschwäche immer weiter zu, so dass die Patienten binnen einiger Jahre an den Rollstuhl gebunden sind. Durch Mitbeteiligung der Schluckmuskulatur tritt in vielen Fällen eine Dysphagie auf [Peng *et al.* 2000].



Abb. 1-1: Fotografie eines Patienten mit sIBM: Zu sehen sind Atrophien des Quadrizeps und der Finger-Flexoren. [Abb. aus Engel und Askanas 2006, S. 21]

1.1.3 Histopathologie und Pathophysiologie

Im Muskel von sIBM-Patienten finden sich typische myopathische Veränderungen, zu denen Faserkalibervariationen, zentrale Kerne und ein bindegewebiger Umbau zählen. Weitere Charakteristika umfassen Einschlusskörperchen und Vakuolen [Carpenter *et al.* 1978]. Neben nekrotischen Muskelfasern gibt es auch regenerierende Fasern [Arnardottir *et al.* 2004] sowie entzündliche Infiltrate. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um $CD8^+$ -T-Zellen, die morphologisch unauffällige Muskelfasern umstellen [Arahata und Engel 1984] [siehe unten Abb. 1-2].

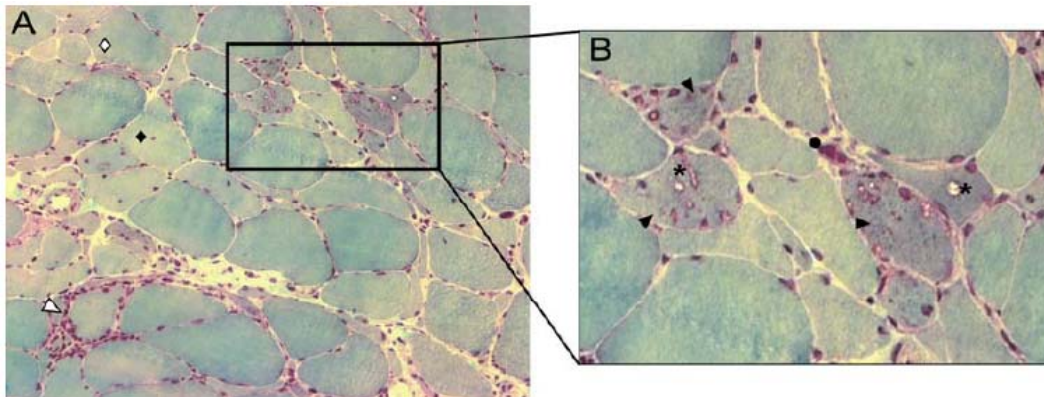


Abb. 1-2: Lichtmikroskopische Charakteristika im sIBM-Gewebe: Trichromfärbung einer sIBM-Muskelbiopsie mit typischen histopathologischen Charakteristika wie ◊: Faserkalibervariationen, ◆: internalisierte Zellkerne, Δ: entzündliche Infiltrate, ▶: Proteinakkumulationen/Einschlusskörperchen, *: red rimmed vacuoles und ●: nekrotische Fasern. Die Aufnahmen in A wurden mit einem 20er Objektiv angefertigt, B zeigt eine Vergrößerung aus A mit vakuolisierten Muskelfasern.

Die Pathophysiologie der sIBM ist sehr komplex und bisher nicht vollständig geklärt bzw. verstanden. Es werden momentan entzündliche, degenerative und Zellstress-assoziierte Pathomechanismen diskutiert, wobei unklar ist, inwieweit diese

miteinander in Verbindung stehen. Des Weiteren wird ein Zusammenhang mit autophagischen Prozessen vermutet [Lünemann *et al.* 2007].

Die Expression pro-inflammatorischer Zytokine und die Präsenz zytotoxischer T-Lymphozyten im Muskelgewebe von sIBM-Patienten deuten auf eine entzündliche Pathogenese hin [Raju *et al.* 2003]. Die Invasion dieser T-Lymphozyten in den Muskel kann durch ein lokales pro-inflammatorisches Milieu begünstigt werden, welches durch die Muskelfasern durch Expression von Zytokinen wie IFN- γ , TNF- α oder IL-1 β [Tews und Goebel 1996], sowie einiger Chemokine [De Paepe *et al.* 2008] selbst generiert werden kann. Ebenso regulieren die Muskelfasern unter entzündlichen Bedingungen die für eine Antigenpräsentation notwendigen MHC-Oberflächenmoleküle hoch [Emslie-Smith *et al.* 1989]. Solch eine chronisch entzündliche Umgebung kann direkt zur massiven Schädigung der Muskelzellen führen, was bereits für IL-1 β [Broussard *et al.* 2004] und TNF- α [Li YP *et al.* 2005] gezeigt wurde.

Neben einer chronischen Entzündung und der Invasion zytotoxischer T-Lymphozyten akkumulieren aberrante Proteine im Muskelgewebe. Das bekannteste dieser Proteine in Muskelfasern mit Vakuolen/Einschlüssen ist β -Amyloid, welches aus dessen Vorläufermolekül *Amyloid Precursor Protein* (APP) generiert wird. Eine Hochregulation von APP im sIBM-Muskelgewebe [Sarkozi *et al.* 1993] und seine experimentelle Überexpression wurde *in vitro* [Askanas *et al.* 1996] und *in vivo* [Sugarman *et al.* 2002] in Zusammenhang mit der in der sIBM gefundenen vakuolären Transformation von Skelettmuskel gebracht. Daher wird die Überexpression von APP als ein frühes Ereignis in der Pathogenese der sIBM angesehen [Wojcik *et al.* 2006].

Als ein weiteres Molekül mit Bezug zur frühen Pathogenese wurde α B-Crystallin in normal erscheinenden Muskelfasern beschrieben [Banwell und Engel 2000]. Es handelt sich hierbei um ein Hitzeschockprotein, was als Chaperon missgefaltete Proteine, einschließlich der Aktin- und Desminfilamente, zurückfaltet und dessen Funktionsverlust mit Proteinaggregationen im Skelettmuskel [Bennardini *et al.* 1992], sowie mit β -Amyloid-Akkumulation beim Morbus Alzheimer [Wilhelmus *et al.* 2006] assoziiert ist. Ebenfalls wurde α B-Crystallin als anti-entzündlicher Mediator in der Experimentellen Autoimmunen Demyelination des ZNS beschrieben [Ousman *et al.* 2007]. Dieser Zellstress könnte im Muskel den chronisch degenerativen Prozess mit irreversiblen Schäden fördern.

Neben β -Amyloid sind viele weitere Proteine, die in degenerativen Erkrankungen gehäuft vorkommen, auch bei der sIBM präsent. Hierzu zählt unter anderem das Marker-Protein Ubiquitin [Askanas *et al.* 1991] oder phosphoryliertes Tau/Neurofilament (P-Tau) [Askanas *et al.* 1994], welches meist in vakuolisierten Fasern im sIBM-Muskel auftritt [Mirabella *et al.* 1996]. Neben den degenerativen Molekülen gibt es eine Reihe an Degenerations-/Regenerations-Markern wie Desmin oder *Neuronal Cell Adhesion Molecule* (NCAM), deren Expression im Gewebe von sIBM-Patienten erhöht ist [Arnardottir *et al.* 2004].

Ein Zusammenhang zwischen entzündlichen und degenerativen Pathomechanismen konnte erstmals 2008 durch Nachweis einer Ko-Lokalisation von β -Amyloid mit IL-1 β im Muskelgewebe von sIBM-Patienten aufgezeigt werden. Zusätzlich wurde *in vitro* demonstriert, dass IL-1 β die β -Amyloid-Akkumulation fördern kann [Schmidt *et al.* 2008]. Der genaue Mechanismus, der sich dahinter verbirgt, ist allerdings noch nicht geklärt.

1.1.4 Diagnostik und Therapie

Die Diagnostik der sIBM ist sehr komplex und noch unzureichend verstanden. Zur Diagnosesicherung wurden 1995 von Griggs und seinen Kollegen Kriterien zusammengestellt, die die klinischen und laborchemischen Befunde, sowie eine negative Familienanamnese einschließen [Griggs *et al.* 1995]. Hierbei gehört zu den klinischen Kriterien ein Fortbestehen der Erkrankung seit über sechs Monaten, ein Manifestationsalter über dem 30. Lebensjahr, sowie eine Muskelschwäche, die die proximalen und distalen Muskeln der Arme und Beine betreffen. Zusätzlich kann eine Schwäche der Finger- oder Hand-Flexoren vorliegen, bei dem die Extensoren weniger stark betroffen sind. Auch kann nur der Quadrizeps eine hohe Muskelschwäche aufweisen [Sayers *et al.* 1992]. Laborchemisch ist die Kreatinkinase nur wenig erhöht [Lotz *et al.* 1989]. Elektromyographische Untersuchungen zeigen Veränderungen, die mit einer entzündlichen Myopathie vereinbar sind [Julien *et al.* 1982]. Gleiches trifft auch auf die Untersuchung des Muskelbiopsates zu. Dieses ist lichtmikroskopisch charakterisiert durch Infiltrationen mononukleärer Zellen um nicht-nekrotische Muskelfasern sowie durch vakuolisierte Muskelfasern [Lotz *et al.* 1989]. Des Weiteren ist das Vorhandensein von intrazellulären β -Amyloid-Ablagerungen durch Fluoreszenz oder von 15-18-nm Tubulofilamenten im Elektronenmikroskop nachweisbar [Mendell *et al.* 1991; Askanas *et al.* 1993].

Bis heute gibt es keine effektive Therapie, die die Erkrankung heilt oder den Krankheitsverlauf, der mit Muskelfaserdegeneration einhergeht, aufzuhalten vermag [Griggs 2006]. Aufgrund des Vorhandenseins entzündlicher Infiltrate im sIBM-Muskel wurden in zahlreichen Studien immunsuppressive bzw. immunmodulatorische Medikamente innerhalb der letzten Jahre getestet.

Die hoch-dosierte Gabe des Glukokortikoids Prednisolon in einer prospektiven Studie über die Dauer von 12 Monaten wies keinen positiven Effekt auf [Barohn *et al.* 1995]. Die intravenöse Gabe von Immunglobulinen zeigte eine geringe Steigerung der Muskelkraft in den Beinen, allerdings bei einer extrem kurzen Studiendauer von nur drei Monaten [Dalakas *et al.* 1997]. Unabhängig davon konnte in einer weiteren Studie durch Gabe von Immunglobulinen über einen Zeitraum von sechs Monaten bei einigen der Patienten zumindest der Krankheitsprogress gestoppt werden [Walter *et al.* 2000]. Das Folsäure-Analogon Methotrexat verhinderte nicht das Fortschreiten der Erkrankung [Badrising *et al.* 2002]. Im Gegensatz dazu führte die Gabe von Methotrexat in Kombination mit intravenöser Gabe eines anti-T-Lymphozyten-Immunglobulins zu einer marginalen Stärkung der Muskelkraft [Lindberg *et al.* 2003]. Das Glykoprotein Interferon- β 1a erwies sich unabhängig von der Konzentration der Dosis als ineffektiv in der Behandlung der IBM [Muscle Study Group 2001; Muscle Study Group 2004]. Alemtuzumab (CAMPATH 1-H), ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der zur Reduktion peripherer Lymphozyten im Blut führt, zeigte in einer Studie lediglich eine Verlangsamung des Erkrankungsfortschritts [Dalakas *et al.* 2009].

Neben der medikamentösen Therapie werden supportive Maßnahmen angewandt, insbesondere gezielte Physiotherapie [Arnardottir *et al.* 2003].

1.2 *High Mobility Group Box 1 (HMGB1) und dessen Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)*

1.2.1 Einführung

Der Transkriptionsfaktor *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) wurde in den 70er Jahren als nukleäres, DNA-bindendes Protein von Goodwin *et al.* beschrieben [Goodwin *et al.* 1973]. Fast 30 Jahre später wurde HMGB1 als extrazelluläres, pro-inflammatorisches Zytokin wiederentdeckt [Wang H *et al.* 1999]. Es gelangt entweder via Nekrose [Scaffidi *et al.* 2002] oder durch aktive Sekretion von Immunzellen [Gardella *et al.* 2002] in den extrazellulären Raum. Dort führt es zur Aktivierung des Immunsystems [Wang H *et al.* 1999] und zur Einleitung von Reparaturprozessen [Palumbo *et al.* 2004] nach einem Gewebeschaden. Seine extrazelluläre, pro-inflammatorische Wirkung erfolgt unter anderem über die Bindung an RAGE [Hori *et al.* 1995].

Membrangebundenes HMGB1 an der Zelloberfläche wachsender Neuriten wird auch Amphoterin genannt. Der Name entstand aufgrund der chemischen Eigenschaften mit einem positiv geladenen Kopf und einem negativ geladenen Schwanz in den 90er Jahren, als noch nicht bekannt war, dass es sich um HMGB1 handelte [Merenmies *et al.* 1991].

1.2.2 Aufbau von HMGB1

HMGB1 besteht aus 215 Aminosäuren. Es enthält zwei Domänen, die jeweils aus 80 Aminosäuren zusammengesetzt sind und als „Box A“ und „Box B“ bezeichnet werden. Diese Domänen interagieren mit der DNA und führen zu Distorsionen und Biegungen der Doppelhelices. Die DNA-bindenden Domänen sind sich ähnlich: Der Unterschied in der Aminosäuresequenz beträgt lediglich 20% [Reeck *et al.* 1982; Hardman *et al.* 1995]. In strukturellen Funktionsanalysen mit rekombinanten Box A und Box B konnte gezeigt werden, dass die Zytokin-Aktivität von HMGB1 auf der Box-B-Domäne liegt (Aminosäuren 89-123), wohingegen rekombinantes Box A als Antagonist wirkt. Es schwächt die HMGB1-induzierte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen ab [Li J *et al.* 2003]. Die *Nuclear localization signals* (NLS1 und NLS2) innerhalb der Box-A- und Box-B-Domänen kontrollieren die Translokation von HMGB1 aus dem Zellkern. NLS1 umfasst die Aminosäuren 28–44, NLS2 die Aminosäuren 180–185 [Bonaldi *et al.* 2003]. HMGB1 kann seinen Rezeptor RAGE über die RAGE-bindende Domäne, die aus den Aminosäuren 150–183 besteht, aktivieren [Hori *et al.* 1995]. Strukturell enthält HMGB1 weiterhin eine hoch konservierte C- und N-terminale Region mit entsprechend vielen Aminosäuren mit sauren und basischen Resten [Reeck *et al.* 1982] (Abb. 1-3).

Passiv freigesetztes HMGB1 variiert in seinem Aufbau von dem von Immunzellen wie z.B. Makrophagen aktiv sekretierten HMGB1. Letzteres enthält Acetylierungen, die zur aktiven Sekretion benötigt werden [Rendon-Mitchell *et al.* 2003].

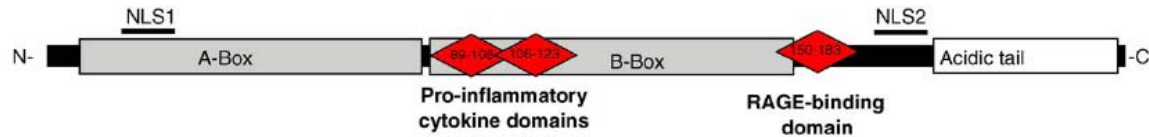


Abb. 1-3: Struktur von HMGB1: HMGB1 besteht aus einer Box-A- und Box-B-Domäne. Die pro-inflammatorischen Eigenschaften sowie die RAGE-Bindestelle liegen auf der B-Box-Domäne. Anhand der *Nuclear localization signals* (NLS1 und NLS2) erfolgt die Translokation in und aus den Zellkern. Innerhalb der hoch konservierten C- und N-terminalen Regionen gibt es entsprechend viele Aminosäuren. [Abb. aus Ulloa und Messmer 2006, S.190]

1.2.3 Zelluläre Expression und Freisetzung von HMGB1

HMGB1 ist in nahezu allen eukaryotischen Zellen wie z.B. Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen [Degryse *et al.* 2001], Monozyten und Makrophagen [Gardella *et al.* 2002] oder in Zellen von Milz, Thymus, Leber oder Hirn [Prasad und Thakur 1990] exprimiert und durch die Evolution hochkonserviert erhalten geblieben (99%-Identität in Säugetieren). Die nukleäre Expression variiert jedoch mit der Entwicklung und dem Alter [Müller *et al.* 2004].

HMGB1 kann via nekrotischen Zelltod [Scaffidi *et al.* 2002] oder durch aktive Sekretion von Immunzellen [Gardella *et al.* 2002] in das extrazelluläre Milieu gelangen. Als Transkriptionsfaktor kann sich HMGB1 schnell an die DNA anlagern und auch wieder lösen und so kontinuierlich zwischen Zellkern und Zytosol translozieren [Bonaldi *et al.* 2003]. Aktive Sekretion von HMGB1 durch Monozyten oder Makrophagen tritt als Antwort auf entzündliche Stimuli wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Zytokine wie TNF- α , IL-1 β [Wang H *et al.* 1999] oder IFN- γ auf [Rendon-Mitchell *et al.* 2003]. Nach Kontakt mit inflammatorischen Stimuli transloziert HMGB1 vom Nukleus in das Zytosol. Der Import in den Nukleus wird durch Acetylierung von Lysin-Resten in dem HMGB1-Molekül blockiert [Bonaldi *et al.* 2003]. Da eine sekretorische Signalsequenz fehlt, wird HMGB1 nicht durch das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat geleitet, sondern in sekretorische Lysosomen verpackt und in den extrazellulären Raum abgegeben. [Gardella *et al.* 2002], wo es seine pro-inflammatorische Wirkung entfaltet.

1.2.4 Funktion von HMGB1

Im Zellkern übernimmt HMGB1 wichtige Funktionen, so dass die meisten Zellen circa eine Million Moleküle davon enthalten [Bianchi 2004]. HMGB1 ist ein sehr mobiles Protein. Seine Dynamik in lebenden Zellen wurde durch Fluoreszenz-markiertes HMGB1 und Photobleaching-Techniken dargestellt [Scaffidi *et al.* 2002]. In diesen Studien wurde gezeigt, dass HMGB1 im Nukleus umherstreut, für Bruchteile einer Sekunde an die DNA bindet und dabei als Transkriptionsfaktor fungiert. Hierbei bindet es ohne Sequenz-Spezifität an die kleine Furche der DNA und ruft dadurch Krümmungen in der helikalen Struktur hervor. Somit werden HMGB1-Interaktionen zwischen DNA und vielen weiteren Faktoren wie p53, NK- κ B, *recombination activating gene 1/2* oder hormonellen Steroid-Rezeptoren ermöglicht [Bianchi 2004]. Dass die nukleäre Funktion von HMGB1

für das Überleben essentiell ist, wurde in *knockout*-Mäusen gezeigt. Diese versterben kurze Zeit nach der Geburt. Phänotypisch fallen sie durch eine kleinere Größe, zerzaustes Fell, lange Hinterbeine und Mangel an Fettpolstern auf [Calogero *et al.* 1999].

HMGB1 kann passiv via Nekrose in den extrazellulären Raum gelangen und dort entzündliche Prozesse auslösen [Scaffidi *et al.* 2002]. Es signalisiert benachbarten Zellen, dass ein Gewebsschaden vorliegt und Reparaturprozesse eingeleitet werden müssen. In Immunzellen führt es zu einer gesteigerten Genexpression pro-inflammatorischer Faktoren [Andersson U *et al.* 2000]. In Monozyten [Rouhiainen *et al.* 2004], vaskulären Muskelzellen [Degryse *et al.* 2001] und Mesangioblasten [Palumbo *et al.* 2004] trägt es zur Zytoskelettorganisation und transendothelialer Migration bei und fördert zum Teil die Proliferation in Myoblasten [De Mori *et al.* 2007]. Im Gegensatz dazu sind Zellen ohne HMGB1 ineffektiv. Die Blockade von HMGB1 *in vivo* reduziert die Leukozyten-Rekrutierung im Modell der akuten hepatischen Nekrose [Scaffidi *et al.* 2002], was darauf hindeutet, dass HMGB1 an der Entzündungsreaktion, hervorgerufen durch Nekrose, beteiligt ist. Bei dem programmierten Zelltod, der Apoptose, kommt es hingegen zu keiner oder nur zu einer gering ausgeprägten Entzündungsreaktion und eine Freisetzung von HMGB1 in das extrazelluläre Milieu findet hierbei nicht statt [Scaffidi *et al.* 2002].

Immunzellen können HMGB1 aktiv sezernieren, wenn diese in Kontakt mit mikrobiellen Erregern oder anderen pro-inflammatorischen Stimuli getreten sind [Wang H *et al.* 1999]. Dadurch wird die Umgebungssituation von unvorhergesehenem Zelltod imitiert. Im Gegensatz zu TNF- α und IL-1 β , die binnen weniger Minuten nach LPS-Stimulation abgegeben werden, wird HMGB1 nach mehreren Stunden *in vitro* [Zimmermann *et al.* 2004] und *in vivo* [Wang H *et al.* 1999] freigesetzt. Somit wird HMGB1 nicht nur von Makrophagen als Antwort auf pro-inflammatorische Stimuli abgegeben, sondern bewirkt auch eine verspätete Entzündungsreaktion. Die Immunantwort wird dadurch aufrecht erhalten und verlängert.

Zusätzlich zu der nukleären Lokalisation exprimieren einige Zellen HMGB1 auf der Plasmamembran. Dieses Membran-assoziierte HMGB1 ist einbezogen in die Leitung des Neuriten-Wachstums [Merenmies *et al.* 1991], die Chemotaxis glatter Muskulatur [Degryse *et al.* 2001] und in die Tumorzell-Metastasierung [Taguchi *et al.* 2000].

1.2.5 Rezeptoren von HMGB1

Der prominenteste Rezeptor für HMGB1 ist RAGE, welcher in den meisten Zellen wie z.B. Neuronen [Hori *et al.* 1995], Endothelzellen [Basta *et al.* 2002], glatten Gefäß-Muskelzellen [Lander *et al.* 1997] oder Entzündungszellen [Rouhiainen *et al.* 2004] exprimiert wird. Membran-gebundenes HMGB1 auf der Zelloberfläche von wachsenden Neuriten bindet mit hoher Affinität an RAGE und treibt hierdurch trophische Effekte wie die Induktion von Neuriten-Wachstum an [Hori *et al.* 1995]. Dagegen induziert die Überaktivierung von RAGE neuronale Apoptose [Huttunen *et al.* 1999]. Die Hemmung der RAGE-Aktivierung unterdrückt die regenerativen Prozesse im peripheren Nerven [Rong *et al.* 2004]. Durch seine Eigenschaft als Rezeptor auf Endothelzellen fördert es die Leukozytenansammlung [Chavakis *et al.* 2003] und wirkt somit pro-inflammatorisch. Der Verlust von RAGE schützt dagegen im Maus-Modell der Sepsis vor Letalität

[Liliensiek *et al.* 2004]. Durch die Blockade von RAGE wird der pro-inflammatorische Effekt von HMGB1 auf Makrophagen und Endothelzellen unterdrückt [Treutiger *et al.* 2003]. Da diese Unterdrückung nur partiell ist, geht man davon aus, dass HMGB1 an weitere Rezeptoren bindet. Kandidaten hierfür sind die Toll-like-Rezeptoren 2 bzw. 4 (TLR2/4), die von Makrophagen exprimiert werden. Murine Makrophagen-Zelllinien, die mit dominant-negativen Konstrukten von TLR2 und TLR4 transfiziert worden sind, zeigten eine verminderte Aktivität nach Stimulation mit rekombinantem HMGB1 [Park *et al.* 2004]. In RAGE-*knockout*-Mäusen konnte eine um 70% verminderte HMGB1-induzierte Zytokin-Sekretion nachgewiesen werden, was ebenfalls auf die Mitbeteiligung weiterer Rezeptoren hindeutet [Kokkola *et al.* 2005].

1.2.6 Struktur und Liganden von RAGE sowie Signaltransduktion

RAGE gehört zu der Immunglobulin (Ig-) Superfamilie der Oberflächenmoleküle. Es besitzt drei extrazelluläre Ig-Domänen, ein transmembranäres Segment sowie einen 43 Aminosäuren langen intrazellulären Schwanz. Die drei Ig-Domänen bestehen aus einer variablen und zwei konstanten Regionen. Die Bindung von Liganden an RAGE erfolgt über die variable Region. Für die intrazelluläre Signalkaskade wird der Aminosäure-Schwanz benötigt [Neeper *et al.* 1992].

Neben HMGB1 sind weitere Liganden von RAGE bekannt. Hierzu zählen unter anderem AGEs (*Advanced Glycation Endproducts*). Dabei handelt es sich um nicht-enzymatische Addukte von Proteinen, die in Zusammenhang mit Systemerkrankungen wie Amyloidose [Miyata *et al.* 1993] oder Diabetes [Koschinsky *et al.* 1997] gebracht werden. Weitere Liganden sind das in Morbus Alzheimer akkumulierende β -Amyloid [Du Yan *et al.* 1997] und das bei systemischer Amyloidose akkumulierende Amyloid A [Yan *et al.* 2000]. Ebenfalls bindet RAGE S100/Calgranulin, welches bei chronischer Entzündung gehäuft auftritt [Hofmann *et al.* 1999] und es interagiert mit Oberflächenmolekülen von Bakterien [Chapman *et al.* 2002], Prionen [Sasaki *et al.* 2002] oder Entzündungszellen [Liliensiek *et al.* 2004].

Durch Bindung von HMGB1 an RAGE werden intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt, die zur Aktivierung des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B führen [Lander *et al.* 1997]. Dieser ist in seiner inaktiven Form im Zytoplasma an seinen Inhibitor I κ B α gebunden. Nach Aktivierung wird I κ B α phosphoryliert, ubiquitiniert und degradiert, was zur Freisetzung und Translokation von NF- κ B in den Nukleus führt [Chen *et al.* 1996]. Dort bindet es an die DNA und fördert unter anderem die Transkription von Zytokinen [Libermann und Baltimore 1990], Adhäsionsmolekülen [Montgomery *et al.* 1991], RAGE [Tanaka *et al.* 2000] sowie von antiapoptotischen Genen [Grimm *et al.* 1996].

1.2.7 Klinische Syndrome, die mit HMGB1 und RAGE assoziiert sind

Erhöhte Level an HMGB1 wurden bei der Sepsis [Sundén-Cullberg *et al.* 2005] und dem Staphylokokken induzierten toxischen Schock-Syndrom (*Toxic Shock Syndrome; TSS*)

[Kalyan und Chow 2008] im Patientenserum detektiert. In Hautläsionen bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses wurden ebenfalls erhöhte Mengen an HMGB1 gefunden [Popovic *et al.* 2005]. Gleiches gilt für die aktiven Herde der Multiplen Sklerose. Die HMGB1-Level im Serum dieser Patienten korrelierten hierbei mit dem Grad der aktiven Entzündung [Andersson A *et al.* 2008]. In zahlreichen weiteren systemischen Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis scheint HMGB1 an der Pathogenese beteiligt zu sein [Taniguchi *et al.* 2003]. In den entzündlichen Muskelerkrankungen Dermatomyositis und Polymyositis konnten HMGB1- und RAGE-positive Fasern mittels immunhistochemischer Färbungen von Muskelgewebe dieser Patienten im Vergleich zu Kontrollen detektiert werden [Ulfgren *et al.* 2004; Haslbeck *et al.* 2005]. Im Blutserum von Schlaganfallpatienten wurden ebenfalls erhöhte Level an HMGB1 nachgewiesen [Goldstein *et al.* 2006]. Eine wichtige Rolle wird HMGB1 auch im Pathomechanismus von Krebserkrankungen [Brezniceanu *et al.* 2003] sowie der Metastasierung [Taguchi *et al.* 2000] zugewiesen. Weitere Systemerkrankungen, die in Verbindung mit RAGE gebracht werden, sind Diabetes-assoziierte Erkrankungen [Wautier *et al.* 1994] und arteriosklerotische Veränderungen [Falcone *et al.* 2005]. Auch im Pathomechanismus der β -Amyloid-assoziierten Morbus-Alzheimer-Demenz sowie der vaskulären Demenz wurde RAGE beschrieben [Yan *et al.* 1998; Emanuele *et al.* 2005].

2 Ziele dieser Arbeit

Die Pathophysiologie der sIBM ist noch unzureichend verstanden. Die Diagnostik ist meist sehr komplex und es gibt keine effektive Therapie. Ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der sIBM bleibt zur Erweiterung der bestehenden diagnostischen Methoden und therapeutischen Optionen eine unabdingbare Grundlage.

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen Entzündung, Zellstress und Degeneration bei der sIBM zu untersuchen, um daraus gegebenenfalls neue diagnostische und therapeutische Optionen ableiten zu können. Im Einzelnen sollten drei übergeordnete Fragestellungen bearbeitet werden:

1. *Welche Rolle spielt das Zellstressmolekül α B-Crystallin bei der Pathologie der sIBM?*

Mittels serieller immunhistochemischer Färbungen und quantitativer Analyse sollten Ko-Lokalisationen von Degenerations-/Regenerations-Markern, entzündlichen Infiltraten sowie α B-Crystallin in Gewebsschnitten von sIBM-Patienten ausgewertet werden. Insbesondere morphologisch unauffällige Muskelfasern sollten bezüglich des Vorhandenseins der genannten Veränderungen betrachtet werden, um eine Überexpression von Markern in einem möglichst frühen Stadium der Muskelschädigung zu erkennen.

2. *Werden HMGB1 und RAGE im Muskelgewebe von sIBM-Patienten überexprimiert?*

Die Expression von HMGB1 und RAGE sollte auf RNA- und Proteinebene im Muskelgewebe von sIBM-Patienten untersucht werden. Anhand serieller Färbungen für die beiden Moleküle mit Degenerations-Markern sollten Ko-Lokalisationen im Gewebe von sIBM-Patienten im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe sowie neuropathischem und dystrophem Gewebe quantitativ analysiert werden.

3. *Welche Interaktionen von pro-inflammatorischem Zellstress, der Expression von HMGB1 und RAGE und der Akkumulation von β -Amyloid gibt es in Muskelzellen?*

In Zellkulturexperimenten sollte die Auswirkung von entzündlichem Zellstress auf die Expression der beiden Moleküle und auf Zelltod hin ermittelt werden. Zusätzlich sollten *in vitro* die Effekte von rekombinantem HMGB1 auf Amyloid-Aggregatbildung und Zelltod erforscht werden. Die Folgen von pro-inflammatorischem Zellstress auf die Amyloid-Aggregation sollten durch Inhibition von HMGB1 mit Box A antagonisiert und neu betrachtet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden und Materialien

3.1.1 Einführung

Zellkultivierung sowie alle Versuche mit Zellkulturen erfolgten unter einer Sterilbank der Sicherheitsklasse II. Alle verwendeten Materialien wurden vor Gebrauch autoklaviert oder hitzesterilisiert. Verwendete Medien und Flüssigkeiten wurden vor Gebrauch in einem externen Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C in einem CO₂-Gehalt von 5% in feuchter Atmosphäre.

Für Versuche mit Zellkulturen wurden zum einen humane, adhärent wachsende Myoblasten der Rhabdomyosarkoma-Zelllinie CCL136 verwendet, deren Verdopplungszeit 24 h beträgt. Zum anderen wurden für Zellkulturexperimente ausgereifte Myotuben von gesunden Kontrollen verwendet, die diskontinuierlich wachsen.

Für die Zellkultivierung von CCL136 wurden Gewebeskulturflaschen (75 cm²) mit dem Nährmedium DMEM (4,5% Glukose) mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin verwendet. Die Beurteilung der Zell-Konfluenz erfolgte lichtmikroskopisch. Ab einer Zellkonfluenz von 80 bis 100 % wurden die Zellen geteilt. Das Ablösen der Zellen erfolgte nach einmaligem Waschen mit warmer PBS und einer ein-minütigen Inkubation bei 37°C in warmem Trypsin (0,05% Trypsin-EDTA) in frischem Medium.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität und Kultivierung von CCL136 auf 24-Kammer-Platten/8-Kammer-Objektträger

Anhand des Trypan-Blau-Testes wurde die Zellvitalität bestimmt. Hierzu wurden dem zum Zählen entnommenen Volumen Zellsuspension (10 µl) die gleiche Menge Trypan-Blau-Lösung dazugegeben und beides vermischt. Anschließend wurden 10 µl dieses Gemisches auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Phasenkontrastmikroskop die gesunden Zellen gezählt.

Zur Kultivierung von CCL136 auf 24-Kammer-Platten wurden sie mit einer Dichte von 1,0 - 2,0 x 10⁴ Zellen/cm² in 500 µl DMEM-Medium pro Kammer ausplattiert, in 8-Kammer-Objektträgern hingegen mit einer Dichte von max. 0,4 x 10⁴ Zellen/Kammer in 300 µl Medium. Die 24-Kammer-Platten/8-Kammer-Objektträger wurden vorsichtig geschwenkt und bis zur nächsten Behandlung in dem Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel vollzogen.

3.1.3 Zytokin-Exposition und HMGB1-Inhibition von Zellkulturen auf 24-Kammer-Platten/8-Kammer-Objektträgern

Ab einer Konfluenz der Myoblasten von etwa 70% bzw. nach Erhalt einer ausdifferenzierten, mehrkernigen Myotubenkultur auf den 24-Kammer-Platten/8-Kammer-Objektträgern erfolgte ein Waschschrift mit 37°C warmer PBS. Anschließend wurden Variationen der pro-inflammatorischen rekombinanten, humanen Zytokine IFN- γ [300 U/ml], TNF- α [10 ng/ml], IL-1 β [20 ng/ml] (alle Chemicon International, Inc., Temecula, USA) sowie humanes rekombinantes HMGB1 [0,3 bzw. 1 μ g/ml] (R&D Systems, Minneapolis, USA) in X-Vivo verdünnt auf die 24-Kammer-Platten/8-Kammer-Objektträger gegeben und bei 37°C für den gewünschten Zeitraum inkubiert. Zusätzlich zu pro-inflammatorischen Zytokinen wurden die Zellen in einigen Experimenten für 72 h mit dem HMGB1-Inhibitor Box A [10 μ g/ml] (HMGBiotech, Italien) inkubiert.

Für den Abbruch der Zytokin-Stimulation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit warmer PBS gewaschen, bevor die Plastikkammern gemäß Herstellerangaben vom Objektträger abgelöst wurden. Die Zellen wurden kurz an der Luft angetrocknet und entweder im Gefrierschrank (-80°C) bis zur nächsten Behandlung aufbewahrt oder fixiert.

3.1.4 Fixierung von 8-Kammer-Objektträgern/Gefrierschnitten

Die 8-Kammer-Objektträger wurde je nach gewünschter Färbung mit Aceton (Ac) oder Paraformaldehyd-Methanol (PFA-Meth) fixiert, Gefrierschnitte dagegen mit Ac oder reinem PFA. Bei der Ac-Fixierung wurden die 8-Kammer-Objektträger/Gefrierschnitte für 10 Min in Ac bei -20°C inkubiert und anschließend an der Luft trocknen gelassen, bevor sie weiterverarbeitet wurden. Bei der PFA-Fixierung wurden die 8-Kammer-Objektträger für 10 Min in 4% PFA bei RT fixiert und anschließend dreimal für 2 Min in PBS gewaschen. Für eine PFA-Meth wurden sie im Anschluss für weitere 10 Min in Meth bei -20°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Schnitte bei -80°C aufbewahrt oder umgehend gefärbt.

3.2 Immunbiologische Methoden und Materialien

3.2.1 Patienten und Kontrollen - Muskelbiopsate

Muskelbiopsate von Patienten und Kontrollen wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und gemäß klinischen, elektrophysiologischen und histologischen Kriterien untersucht (1.1.3). Aus den Biopsaten wurden Gefrierschnitte für Färbungen hergestellt und/oder die RNA extrahiert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben, um mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*Real-time Polymerase Chain-Reaction*;

RT-PCR) die Expression verschiedener Marker zu untersuchen. Für Zellkulturversuche wurden die Biopsate aufgereinigt und in Kultur genommen [Schmidt *et al.* 2008].

3.2.2 Hämalaun und Eosin-Färbung von Kryoschnitten

Für die Hämalaun und Eosin (H&E)-Färbung wurden die Gefrierschnitte mit PFA fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und für 5–7 Min in Hämalaun nach Mayer inkubiert. Daraufhin wurden sie für 5–10 Min mit handwarmem H₂O gewässert. Anschließend wurden sie für 30 Sek mit Eosin gefärbt und erneut mit H₂O gespült. Abschließend wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 5 Min zweimal in 70%-, 96%- sowie 99%-Ethanol und zweimal in Xylol für 10 Min inkubiert. Zum Schluss wurden die Schnitte eingedeckelt.

3.2.3 Trichrom-Färbung nach Gomori

Die entparaffinierten Schnitte wurden für die Trichromfärbung nach Gomori in H₂O gewaschen und in Bouinsche Lösung bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Anschließend wurden sie in fließendem H₂O gründlich auswaschen, bis die Farbe verschwunden ist und mit Weigertschem Eisenhämatoxylin für 2 Min die Kerne gefärbt. Abermals wurden die Schnitte in fließendem H₂O für 10 Min gewaschen und dann für 10-20 Min in der Trichromlösung inkubiert. Danach wurden die sie in 0,5%iger Essigsäure 2 Min lang gespült, um in absteigender Isopropanolverdünnung, beginnend mit 90%tiger Lösung und abschließend mit Xylol gewaschen und eingedeckelt.

3.2.4 Immunzytochemische/immunhistochemische Färbungen

Für immunzyto-/immunhistochemische Färbungen wurden die 8-Kammer-Objektträger bzw. die Gefrierschnitte der Patienten entsprechend der gewünschten Färbung fixiert. Bei Verwendung der Antikörper für β -Amyloid, HMGB1 und P-Tau wurde Gewebe mit PFA bzw. Zellkulturen mit PFA-Meth fixiert, bei Verwendung aller anderen Antikörper wurde die Ac Fixierung verwendet. Anschließend wurden die einzelnen Kammern bzw. das Gewebe mit Pap-Pen umrahmt. Nach 30 Min Blockierung mit einem 1:1 Gemisch aus 10% BSA und 100% Ziegen Serum folgte die Inkubation mit dem in 1 x BSA verdünnten jeweiligen Primäntikörper über 1 h, wenn nicht anders in Tabelle 1 beschrieben. Anschließend wurden die Objektträger dreimal in PBS gewaschen, bevor die 45 Min Inkubation mit dem entsprechenden Fluoreszenz-markierten Sekundäntikörper erfolgte. Im Fall einer Mehrfachfärbung erfolgte entweder eine weitere Primär- und Sekundäntikörper-Inkubation oder direkt eine DAPI Färbung. Danach wurden die Objektträger kurz getrocknet, mit Fluoromount-G eingedeckelt und im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Alle Antikörper-Inkubationen erfolgten in einer dunklen, feuchten Kammer.

Tabelle 1: Primärantikörperliste: Liste der für die immunzyto- und immunhistochemischen Färbungen verwendeten Antikörper. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei Raumtemperatur, wenn nicht anders beschrieben.

Spezifität	Hersteller	Spezies und Klon	Inkubation und Verdünnung oder Konzentration
α B-Crystallin	Serotec, Oxford, UK	Kaninchen polyklonal	1 h; 1:1000
APP	R&D, Minneapolis, USA	Ziege polyklonal	1 h; 10 μ g/ml
β -Amyloid	Signet, Dedham, USA	Maus Klon 6E10	24 h/4°C; 10 μ g/ml
Desmin	Abcam Inc., Cambridge, USA	Kaninchen polyklonal	1 h, 30 μ g/ml
HMGB1	Abcam Inc., Cambridge, USA	Kaninchen polyklonal	1 h, 1:100
MHC-I	Serotec, Oxford, UK	Ratte Klon YTH 826.2	1 h, 5 μ g/ml
MHC-II	Ancell, Bayport, USA	Maus Klon TDR31.1	1 h, 1:100
NCAM	Labvision/Neomarkers, Fremont, USA	Maus Klon Eric-1	1 h, 2 μ g/ml
P-Tau	Abcam Inc., Cambridge, USA	Maus monoklonal sm131	1 h, 1:2000
RAGE	Abcam Inc., Cambridge, USA	Kaninchen polyklonal	1 h, 1:100
RAGE	Chemicon, Temecula, USA	Maus monoklonal	1 h, 1:100
Ubiquitin	DAKO, Carpinteria, USA	Kaninchen polyklonal	0,5 h, 15 μ g/ml

3.2.5 ThioflavinS-Färbung

Die ThioflavinS-Färbung dient dem Nachweis von Amyloid-Aggregaten [Bussière *et al.* 2004]. Hierzu wurden die 8-Kammer-Objektträger mit PFA-Meth fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit H₂O erfolgten je eine 5-minütige Inkubationen in 1%-ThioflavinS und 70%-Ethanol. Daran schlossen sich Waschschritte mit H₂O, sowie zweimal mit PBS, die Zellkerngegenfärbung mit DAPI und das Eindeckeln mit Fluoromount-G an. Da die ThioflavinS-Färbung schnell an Intensität verliert, wurde am darauffolgenden Tag die Fluoreszenz-mikroskopische Analyse durchgeführt, wobei der Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-Filter zur Visualisierung eingesetzt wurde.

3.2.6 Propidiumiodid-Färbung

Die Zelltodfärbung mit Propidiumiodid (PI) erfolgte direkt im Medium der 8-Kammer-Objektträger mit 2 μ g/ml PI für 20 Min bei 37°C. Nach zweimaligem Waschen mit warmer PBS wurden die Objektträger mit Mowiol[®] eingedeckelt. Spätestens am darauffolgenden Tag erfolgte die Fluoreszenz-mikroskopische Analyse, wobei der Texas Red Filter zur Visualisierung eingesetzt wurde.

3.2.7 Fluoreszenz-mikroskopische Analyse

Die Untersuchung und Visualisierung der fluoreszent markierten Zellen bzw. der Gewebsschnitte erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M unter Verwendung von 20er oder 40er Objektiven, wobei die Filtereinstellungen entsprechend der Emissionswellenlänge des jeweiligen Farbstoffes verwendet wurden. Die Aufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera der Firma Intas angefertigt und die jeweiligen

Einstellungen für einen experimentellen Ansatz konstant gehalten. Für die Grauwertanalyse wurden die Aufnahmen zunächst mit IrfanView invertiert und anschließend mittels Scion Image die medianen Grauwerte bestimmt. Pro Gruppe wurden mind. 4 Aufnahmen mit einem 20er Objektiv analysiert.

3.2.8 Durchflusszytometrie (fluorescent activating cell sorting; FACS)

Für FACS-Experimente wurden Myoblasten verwendet. Diese wurden auf einer 24-Kammer-Platte ausplattiert und ab einer Konfluenz von circa 60-70% über 72 h zu Zytokin-Variationen von IFN- γ und TNF- α exponiert. Am Tag der Messung betrug die Konfluenz pro Kammer 100%. Der Überstand wurde zu Versuchsbeginn in 500- μ l-Eppendorf Gefäße überführt und zentrifugiert (3000 Umdrehungen pro Minute, 5 Min; RT) bevor der Überstand erneut in 500- μ l-Eppendorf Gefäße überführt und diese bei -80°C für weitere Experimente aufbewahrt wurden. Die Zellen wurden vorsichtig mit warmer PBS gewaschen und 1 Min bei 37°C in 200 μ l Trypsin inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit 500 μ l kaltem DMEM-Medium wurden die Zellen abgelöst und in die entsprechenden Röhrchen überführt. Zunächst wurden die Zellen abzentrifugiert (300 g, 5 Min, RT), zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 50 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 45 Min Inkubation bei 4°C mit 1:500 verdünnten Maus-Anti-RAGE-Primärantikörper. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen in 50 μ l FACS-Puffer mit 1:500 verdünntem, Alexa-488-gekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper resuspendiert und 30 Min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Myoblasten in 200 μ l FACS-Puffer gelöst. Falls zeitgleich eine Zelltoduntersuchung stattfand, wurde der Farbstoff 7-Aminoactinomycin (7AAD) [4 μ g/ml] dazugegeben, bevor die Messung über ein BD FACS Calibur mit Cell Quest Pro erfolgte. Die Analyse wurde im Anschluss mit WinMDI 2.8 durchgeführt.

3.2.9 Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für HMGB1

Der Sandwich-ELISA wurde in Kooperation mit PD Dr. Voll aus Erlangen durchgeführt. Der Überstand von 24 h, 48 h, sowie 72 h Zytokin-exponierten Myoblasten- und Myotubenkulturen wurde abgenommen und die Menge an HMGB1 gemäß des etablierten Protokoll detektiert [Urbonaviciute *et al.* 2007].

3.3 Molekularbiologische Methoden und Materialien

3.3.1 RNA-Extraktion aus Gewebe/Zellkultur (24-Kammer-Platte)

Die gesamte RNA-Extraktion wurde auf Eis durchgeführt. Für die RNA-Extraktion aus der Zellkultur (24-Kammer-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 H₂O eluiert und direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert. Frisches oder gefrorenes Gewebe wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben, 500 µl Trizol hinzugefügt und mit einem Zelmörser homogenisiert. Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei RT wurden die Eppendorf-Gefäße für 10 Min bei 4°C mit 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorf-Gefäße überführt. 5 µg „linear Acrylamid“ (Ambion 9520) wurden dazugegeben und die Eppendorf-Gefäße für 10 Sek gemischt. Danach wurden 100 µl Chloroform dazugegeben, erneut für 30 Sek gemischt und für 5 Min bei 4°C mit 14000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und 240 µl Isopropanol dazugegeben. Die Eppendorf-Gefäße wurden geschüttelt und gemischt. Die Präzipitation erfolgte für 30 Min bei -80°C. Anschließend wurden sie für 30 Min bei 4°C mit 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl RNase-freiem 70%-Ethanol gewaschen und erneut für 10 Min bei 4°C mit 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, verworfen und die Eppendorf-Gefäße für 1 Min abzentrifugiert, um den restlichen Überstand zu entfernen. Nachdem das Pellet für 1–2 Min an der Luft getrocknet worden war, wurde die RNA in 33 µl RNase-freiem Wasser gelöst, die Konzentration bestimmt und die RNA bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit wurde das NanoDrop-Spektrophotometer entsprechend der Herstellerangaben benutzt.

3.3.2 cDNA-Synthese

Zur Synthese der zur mRNA komplementären cDNA (*complementary DNA*) wurde der SuperScriptTM II Kit entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde als Primer für diese RNA-abhängige DNA-Polymerase ein Oligo-Desoxythymidin-Nukleotid (10–15 Desoxythymidin), welches komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA ist, eingesetzt und über einen Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix und die reverse Transkriptase der komplementäre cDNA-Strang vervollständigt. In der sich anschließenden Reaktion wird die Ursprungs-RNA eliminiert und eine doppelsträngige cDNA gebildet. Diese wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.3 Real-time-Polymerase-Kettenreaktion

Die RT-PCR wurde basierend auf dem TaqMan[®]-Sonden-System von Applied Biosystems an einem 7500 Real-Time-PCR-System mit FAM-markierten Primer/Proben durchgeführt. Die verwendeten Primer (alle von Applied Biosystems, Foster City, USA) sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Primer Proben der RT-PCR: Angegeben sind die Primer mit der Assay ID.

Primer

Assay ID

Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	Hs99999905_m1
High Mobility Group Box 1 (HMGB1)	Hs01923466_g1
Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)	Hs00179504_m1

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression der Marker HMGB1 und RAGE wurden pro 20 µl Ansatz 10 µl PCR 2 x Mix; 8,5 µl H₂O; 0,04 µl ROX; 0,5 µl cDNA und 1 µl Primer Probe verwendet. Im PCR 2x Mix waren die Taq-DNA-Polymerase, Magnesiumchlorid, DNA-Glykosylasen, Desoxyribonukleosidtriphosphate 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 3 aufgeführten Einstellung.

Tabelle 3: Einstellung der RT-PCR: Angegeben sind die einzelnen Zyklen mit ihrer jeweiligen Dauer und Temperatur.

RT-PCR Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklenzahl
Initialisierung	2 Min	50°C	
Hitzeaktivierung	10 Min	95°C	
Hybridisierung	15 Sek	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), einem Haushaltsgen, gemessen und verrechnet.

3.4 Statistische Methoden

Für alle statistischen Analysen wurde mit den Programmen Microsoft Exel 2003 oder Graph Pad Prism V4 gearbeitet. Unterschiede zwischen zwei Kollektiven wurden anhand des T-Tests ungleicher Varianzen unter Anwendung von Microsoft Exel 2003 berechnet. Korrelationen wurden mit Hilfe von Graph Pad Prism V4 bestimmt. Signifikanzen wurden wie folgt definiert: * = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$ und *** = $P \leq 0,001$. Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) sind in Prozent angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 *Interaktion von degenerativen, entzündlichen und Zellstress-assoziierten Markern im Skelettmuskel der sIBM*

Die Pathologie der sporadischen Einschlusskörpermyositis (sIBM) ist sehr komplex und zeichnet sich sowohl durch entzündliche [Lotz *et al.* 1989] als auch degenerative [Mendell *et al.* 1991] Pathomechanismen und Zellstress [Banwell und Engel 2000] aus. Allerdings ist es bisher unzureichend verstanden, ob eine direkte Verknüpfung zwischen diesen Mechanismen besteht, oder ob sie unabhängig von einander auftreten. Um Aufschluss über das Netzwerk molekularer Pathomechanismen im sIBM-Muskel zu erlangen, wurde mittels serieller immunhistochemischer Doppelfärbungen von sIBM-Muskelgewebe die Expression und Ko-Lokalisation Degenerations-/Regenerations-, Entzündungs- und Zellstress-assoziiierter Marker quantifiziert.

4.1.1 **Quantitative Analyse seriell gefärbter sIBM-Gefrierschnitte für Degenerations-/Regenerations-, Zellstress- und Entzündungs-Marker**

Gefrierschnitte von 10 sIBM-Patienten wurden in Serie gefärbt. Hierbei wurden morphologische Veränderungen histochemisch anhand der H&E- und Trichrom-Färbungen dargestellt und insbesondere atrophe, hypertrophe und nekrotische Muskelfasern sowie Fasern mit Vakuolen/Einschlüssen und solche, die von entzündlichen Infiltraten umgeben waren, analysiert. Immunhistochemisch wurden der Degenerations-Marker β -Amyloid durch einen monoklonalen Antikörper (6E10), der spezifisch für ein Epitop im Bereich der Aminosäuren 1–17 der β -Amyloidsequenz ist, angefärbt. Sein Vorläufermolekül *Amyloid Precursor Protein* (APP) und Ubiquitin, sowie die Degenerations-/Regenerations-Marker *Neuronal Cell Adhesion Molecule* (NCAM) und Desmin und als Zellstressmarker das Hitzeschockprotein α B-Crystallin wurden ebenfalls immunhistochemisch dargestellt (Abb. 4-1).

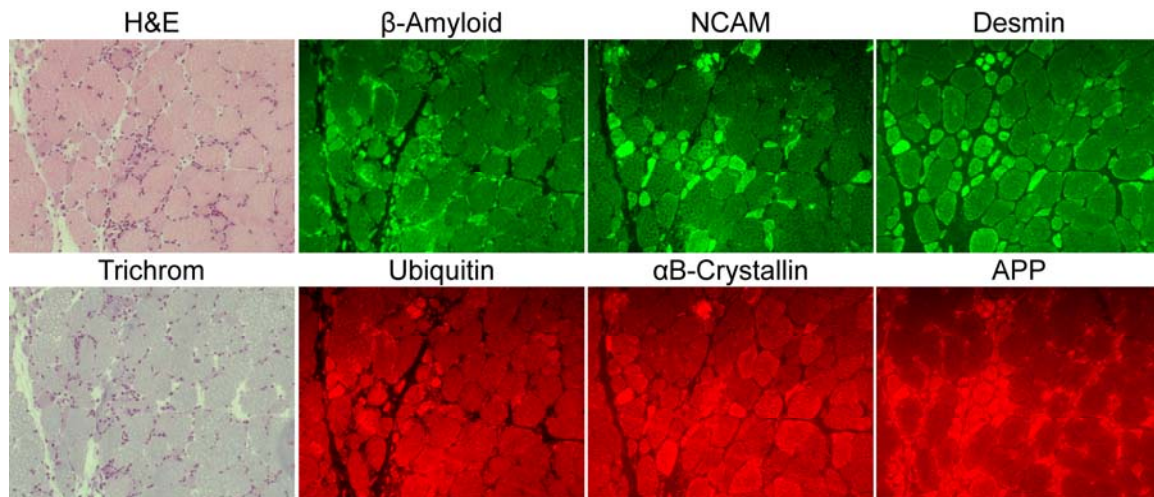


Abb. 4-1: Serielle Färbung für Degenerations-, Regenerations- und Zellstress-assoziierte-Marker im Muskelgewebe von sIBM-Patienten: Histochemie: H&E, Trichrom, Immunhistochemie: β -Amyloid, NCAM, Desmin, Ubiquitin, α B-Crystallin und APP. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte eines Gewebsschnittes eines sIBM-Patienten mit einem 20er Objektiv.

Pro Patient wurden zwischen 80 und 299 Muskelfasern (Gesamtfaserzahl 1418) aus korrespondierenden Arealen aller serieller Färbungen mittels einer CCD-Kamera mit einem 20er Objektiv fotografiert und bezüglich Morphologie und Expression der Marker quantitativ analysiert. Bei der mikroskopischen, quantitativen Auswertung aller Fasern waren $22,6 \pm 9,3\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) dieser positiv für β -Amyloid (Abb. 4-2). Überexpression des Vorläufermoleküls APP zeigte etwa doppelt so viele Muskelfasern ($37,4 \pm 12,8\%$). Das Markierungs-Molekül Ubiquitin war in $21,8 \pm 9,6\%$ aller Fasern vorhanden. Die Proteine Desmin ($32,0 \pm 8,3\%$), NCAM ($25,5 \pm 9,0\%$) und α B-Crystallin ($28,3 \pm 9,4\%$) waren zu einem ähnlichen Prozentsatz in den Muskelfasern überexprimiert. Mittels H&E- und Trichrom-Färbung wurden lichtmikroskopisch morphologische Veränderungen analysiert. Hierbei wurden $37,8 \pm 11,8\%$ atrophe Muskelfasern ermittelt. Von allen untersuchten Fasern enthielten $21,9 \pm 10,0\%$ intrazelluläre Vakuolen oder Einschlüsse und entzündliche Infiltrate wurden in $7,6 \pm 4,1\%$ der Fasern vorgefunden. Anzeichen einer Hypertrophie wiesen $14,1 \pm 10,3\%$, die von Nekrose $0,4 \pm 0,6\%$ der Fasern auf.

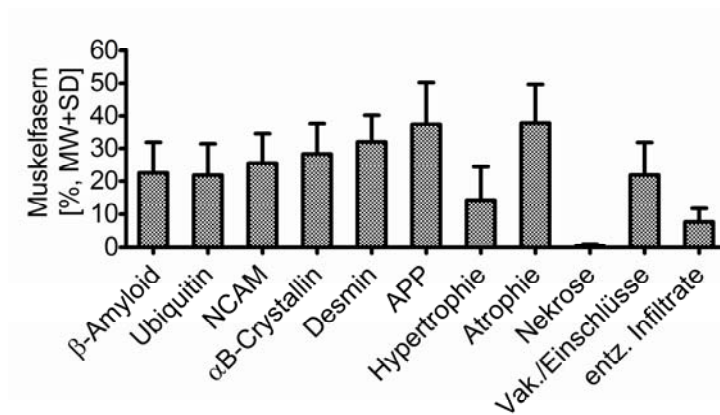


Abb. 4-2: Quantitative Analyse Degenerations-, Regenerations- und Zellstress-assoziiierter Marker sowie morphologischer Veränderungen im Muskelgewebe von 10 sIBM-Patienten: Prozentualer Anteil aller untersuchten Marker und morphologischer Veränderungen. Pro Patient wurden zwischen 80 und 299 Muskelfasern (gesamt 1418) bezüglich Morphologie und Expression der Marker analysiert. (Daten angegeben als Mittelwert + Standardabweichung.)

4.1.2 Assoziation zwischen α B-Crystallin und Degenerations-Markern

Die Hochregulation des Zellstress-Moleküls α B-Crystallin wurde im Skelettmuskel der sIBM beschrieben [Banwell und Engel 2000]. Um die Relevanz von α B-Crystallin als Pathomechanismus der sIBM zu erörtern, wurden Ko-Lokalisationen von α B-Crystallin mit Degenerations-/Regenerations- und Entzündungs-Markern immunhistochemisch untersucht (Abb. 4-3).

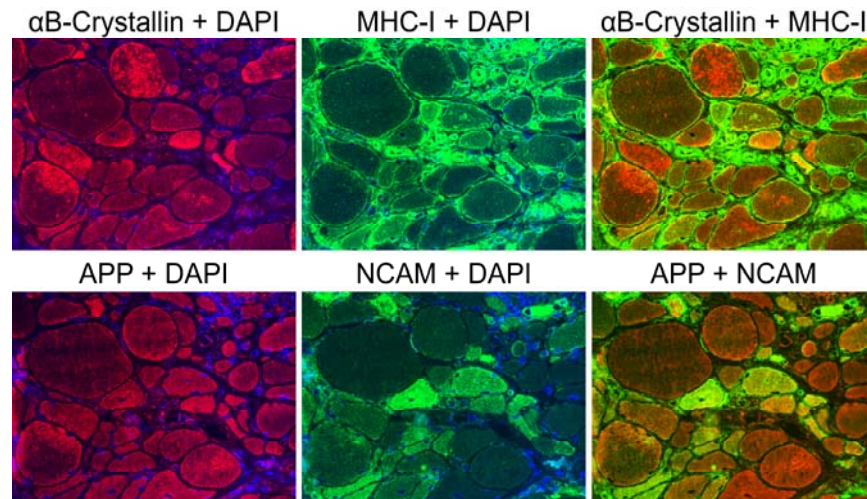


Abb. 4-3: Serielle Färbung für Degenerations-, Regenerations- und Zellstress-assoziierte Marker im sIBM-Muskelgewebe: Repräsentative Ausschnitte einer immunhistochemischen Doppelfärbung für α B-Crystallin (rot), APP (rot), MHC-I (grün) und NCAM (grün). Zellkerngegenfärbungen erfolgten mit DAPI. Die Aufnahmen wurden mit einem 40er Objektiv angefertigt.

Bei der quantitativen Analyse aller α B-Crystallin-positiven Muskelfasern waren die Degenerations-Marker β -Amyloid ($41,0 \pm 12,3\%$) und Ubiquitin ($45,1 \pm 14,2\%$) zu etwa 40% innerhalb dieser Fasern vorhanden, wohingegen APP ($56,0 \pm 11,7\%$) zu einem

deutlich höheren Prozentsatz in den α B-Crystallin-positiven Fasern detektiert wurde. Etwa 60% dieser Fasern waren ebenfalls positiv für NCAM ($57,4 \pm 14,9\%$) und Desmin ($66,4 \pm 11,6\%$). Von entzündlichen Infiltraten waren $13,1 \pm 9,3\%$ der α B-Crystallin-positiven Muskelfasern umgeben (Abb. 4-4).

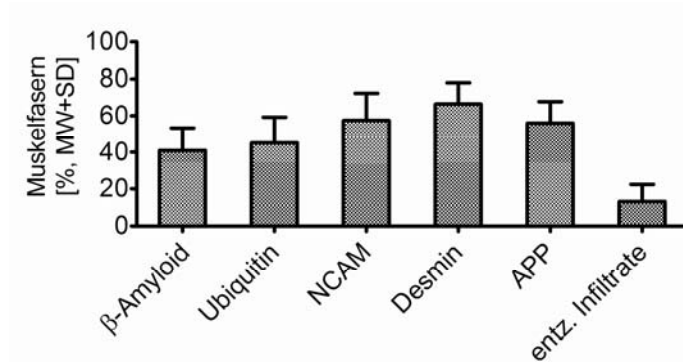


Abb. 4-4: Analyse α B-Crystallin-positiver Muskelfasern: Quantifizierung von Degenerations- und Regenerations-Markern sowie entzündlicher Infiltrate in α B-Crystallin-positiven Fasern im Muskelgewebe von 10 Patienten mit sIBM. (Daten angegeben als Mittelwert + Standardabweichung.)

Der Zusammenhang zwischen α B-Crystallin mit weiteren Degenerations-/Regenerations-Markern, sowie mit morphologischen Veränderungen wurde anhand von Korrelationen untersucht. Hierbei fand sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen α B-Crystallin-positiven Muskelfasern mit APP- ($***P < 0,0001$), β -Amyloid- ($***P < 0,0001$) und Ubiquitin-positiven Muskelfasern ($***P < 0,0001$). Ebenfalls korrelierten α B-Crystallin-positiv Muskelfasern signifikant mit den Degenerations-/Regenerations-Markern NCAM ($***P < 0,0001$) und Desmin ($***P < 0,0001$). Eine signifikante Korrelation wurde ebenso mit morphologischen Veränderungen wie Vakuolen/Einschüsse ($***P < 0,001$), Atrophie ($***P < 0,0001$) oder entzündlichen Infiltraten ($**P < 0,01$) festgestellt. (Abb. 4-5).

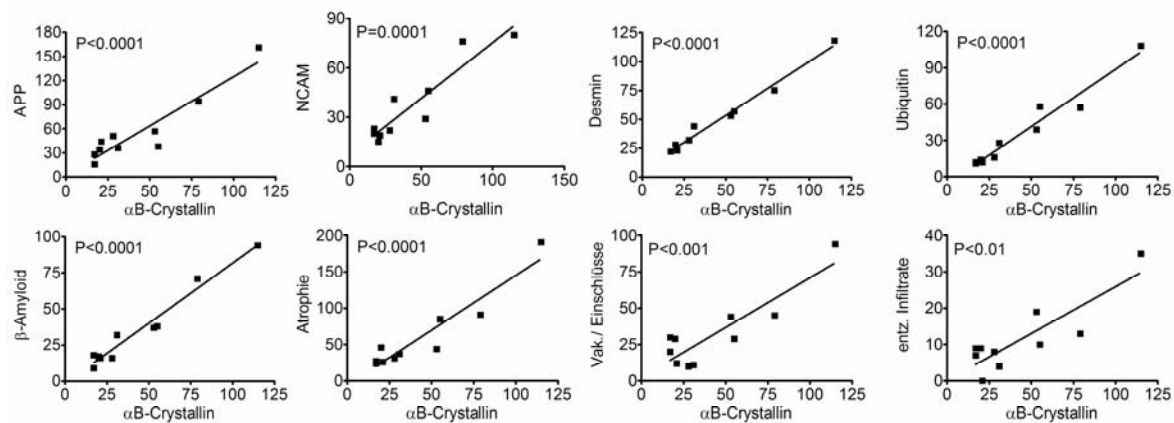


Abb. 4-5: Korrelationsanalyse (Pearson r) von α B-Crystallin mit Degenerations- und Regenerations-Markern und morphologischen Veränderungen: α B-Crystallin korreliert signifikant mit APP, β -Amyloid, NCAM, Desmin, Ubiquitin und den morphologischen Veränderungen Atrophie, Vakuolen/Einschlüsse und entzündlichen Infiltraten.

4.1.3 Expression von α B-Crystallin in normal erscheinenden Muskelfasern

Um frühe Veränderungen der sIBM-Pathologie im Muskel zu erkennen, wurde die Expression von Degenerations-/Regenerations-, Zellstress- und Entzündungs-Markern in normal erscheinenden Muskelfasern untersucht. Normal erscheinende Muskelfasern wurden hierfür als solche definiert, die lichtmikroskopisch weder Zeichen von Atrophie, Hypertrophie oder Nekrose, noch Vakuolen/Einschlüsse aufwiesen. Innerhalb dieser zeigte ein beachtlicher Teil der Muskelfasern eine Überexpression von α B-Crystallin ($15,9 \pm 8,6\%$) (Abb. 4-6). Ähnliche Ergebnisse wurden auch von einer anderen Arbeitsgruppen beschrieben, die die morphologisch unauffälligen, α B-Crystallin-positiven Muskelfasern als „*X-fibres*“ bezeichnete [Banwell und Engel 2000]. APP-positive Muskelfasern waren in etwa dem gleichen Prozentsatz ($19,4 \pm 16,1\%$) in den morphologisch unauffälligen Muskelfasern vorhanden. Alle anderen untersuchten pathologischen Marker wiesen einen deutlich geringeren Prozentsatz auf: NCAM $5,0 \pm 4,7\%$, Desmin $10,5 \pm 7,6\%$ und Ubiquitin $9,7 \pm 7,2\%$.

Die genauere Betrachtung der *X-fibres* zeigte, dass nur $2,8 \pm 4,6\%$ dieser α B-Crystallin-positiven, morphologisch unauffälligen Muskelfasern von entzündlichen Infiltraten umgeben waren, wohingegen $17,6 \pm 19,8\%$ dieser Fasern positiv für APP und negativ für β -Amyloid und ein geringerer Prozentsatz von $8,6 \pm 12,2\%$ positiv für beide Degenerations-Marker waren (Abb. 4-6).

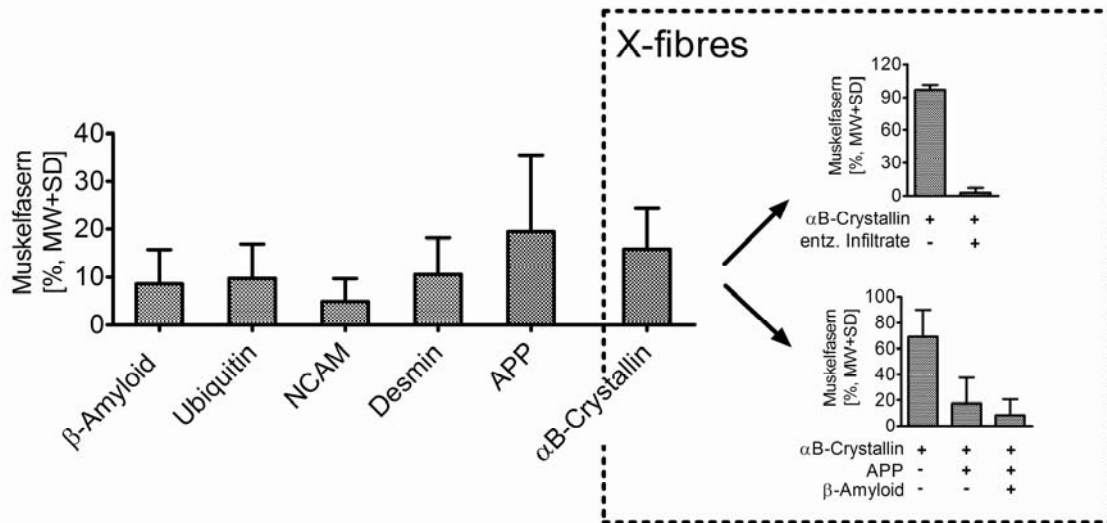


Abb. 4-6: Analyse morphologisch unauffälliger Muskelfasern: Quantifizierung der Expression der Marker in morphologisch unauffälligen Muskelfasern, sowie entzündlicher Infiltrate und die Expression von APP und β-Amyloid in αB-Crystallin-positiven, morphologisch unauffälligen Muskelfasern (*X-fibres*). (Daten angegeben als Mittelwert + Standardabweichung.)

Aufgrund dieser Daten könnte sich eine frühe sIBM-Pathologie um APP/αB-Crystallin ko-expressierende Muskelfasern zentrieren. Um dieses genauer zu betrachten, wurde der Zusammenhang zwischen APP/αB-Crystallin-doppelt-positiven Muskelfasern mit Degenerations-Markern analysiert. Hierbei fiel auf, dass Akkumulationen von β-Amyloid ($60,8 \pm 14,5\%$) und Ubiquitin ($59,5 \pm 20,7\%$) zu einem ähnlichen Prozentsatz in den APP/αB-Crystallin-doppelt-positiven Muskelfasern vorhanden waren. Hingegen war ein wesentlich höherer Prozentsatz positiv für die Degenerations-/Regerations-Marker NCAM ($79,2 \pm 15,4\%$) und Desmin ($88,7 \pm 10,5\%$). Entzündliche Infiltrate fanden sich in $18,3 \pm 13,5\%$ dieser Fasern (Abb. 4-7).

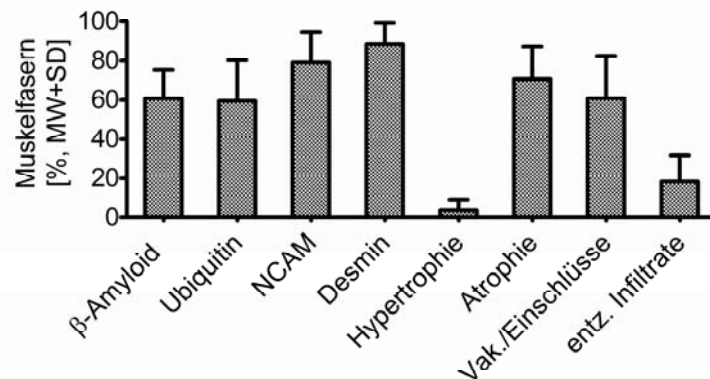


Abb. 4-7: Analyse von APP/αB-Crystallin ko-expressierenden Muskelfasern: Quantifizierung von Degenerations-/Regerations-Markern sowie morphologischer Veränderungen im Muskelgewebe. (Daten angegeben als Mittelwert + Standardabweichung.)

4.1.4 Pathologische Veränderungen assoziiert mit β -Amyloid

Die Relevanz der Überexpression von APP und die Akkumulation von β -Amyloid in der sIBM-Pathologie wurde durch die Analyse der Expression beider Degenerations-Marker in den seriellen Färbungen weiter untersucht. Hierbei fiel auf, dass nur $45,3 \pm 14,2\%$ der APP-positiven Muskelfasern Akkumulationen von β -Amyloid aufwiesen, wohingegen die überwiegende Anzahl an β -Amyloid-positiven Muskelfasern APP überexprimierte ($74,5 \pm 13,3\%$). Die Mehrzahl der β -Amyloid-positiven Muskelfasern wiesen außerdem eine Überexpression weiterer Degenerations-/Regenerations- und Zellstress-Marker sowie morphologische Veränderungen auf (Abb. 4-8). Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in APP-positiven Muskelfasern, sowie in Muskelfasern mit Vakuolen/Einschlüssen gefunden.

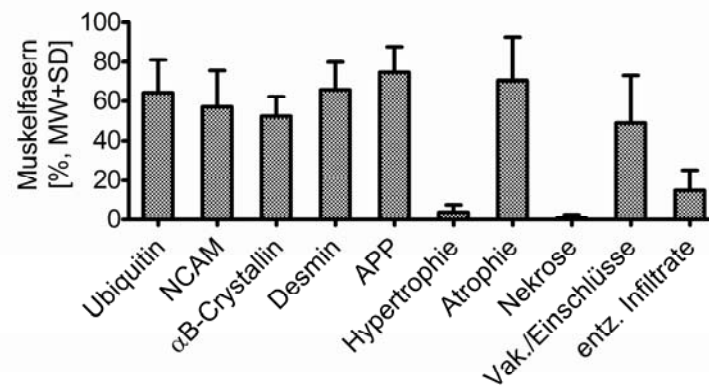


Abb. 4-8: Analyse β -Amyloid-positiver Muskelfasern: Quantifizierung von Degenerations-, Regenerations- und Zellstress-Markern und morphologischer Veränderungen in β -Amyloid-positiven Muskelfasern. (Daten angegeben als Mittelwert + Standardabweichung.)

Die Assoziation zwischen der Akkumulation von APP/ β -Amyloid mit anderen Degeneration-/Regenerations-Markern wurde zusätzlich anhand von Korrelationen analysiert. Diese Untersuchungen zeigten eine signifikante Korrelation zwischen APP/ β -Amyloid-positiven Muskelfasern mit solchen, die positiv für Ubiquitin ($***P < 0,001$), Desmin ($***P < 0,0001$) sowie NCAM ($**P < 0,01$) waren. Des Weiteren korrelierten APP/ β -Amyloid-positive Muskelfasern mit morphologischen Veränderungen wie Atrophie ($***P = 0,001$) und Vakuolen/Einschlüsse ($***P = 0,001$). Im Einklang mit kürzlich erschienenen Beobachtungen [Schmidt *et al.* 2008], korrelierten APP/ β -Amyloid-positive Muskelfasern ebenfalls signifikant mit solchen, die von entzündlichen Infiltraten umgeben waren ($**P < 0,01$).

4.2 Expression von HMGB1 und RAGE im Skelettmuskel der sIBM

Die Pathophysiologie der sIBM ist noch unzureichend verstanden. Die Verbindung von α B-Crystallin-assoziiertem Zellstress und der Akkumulation von β -Amyloid konnte im vorangegangenen Teil dieser Dissertation gezeigt werden. Ferner gibt es bei der sIBM einen Zusammenhang von Entzündung und der Akkumulation von β -Amyloid [Schmidt

et al. 2008]. Die Entzündungsmarker HMGB1 und RAGE könnten hierbei eine Rolle spielen. Eine erhöhte Expression beider Moleküle wurde bereits bei der Dermato- und der Polymyositis gezeigt [Ulfgren *et al.* 2004; Haslbeck *et al.* 2005] und RAGE wurde ebenfalls als Rezeptor für β -Amyloid in Zusammenhang mit degenerativen Prozessen beim Morbus Alzheimer gebracht [Yan *et al.* 1998]. Aufgrund dieser Überlegungen wurde die Expression beider Moleküle auf mRNA- und Proteinebene im Skelettmuskel von sIBM-Patienten untersucht und anhand serieller Färbungen Ko-Lokalisationen mit Degenerations-Markern erforscht.

4.2.1 Quantifizierung der Expression von HMGB1 und RAGE auf mRNA- und Proteinebene im Gewebe von sIBM-Patienten im Vergleich zu nicht-myopathischen Kontrollen

Mittels quantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression von HMGB1 und RAGE im Gewebe von Patienten mit sIBM (n=10) im Vergleich zu Kontrollen mit unauffälliger Muskelbiopsie (n=8), Dystrophie- (n=6) und Neuropathie-Patienten (n=5) untersucht. Eine signifikant höhere Expression beider Moleküle fand sich im Gewebe von sIBM-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Im Gegensatz zur Expression von RAGE, war die von HMGB1 ebenfalls bei Neuropathie-Patienten gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Hingegen wurde keine signifikante Steigerung der Expression beider Moleküle im Gewebe von Dystrophien gefunden (Abb. 4-9).

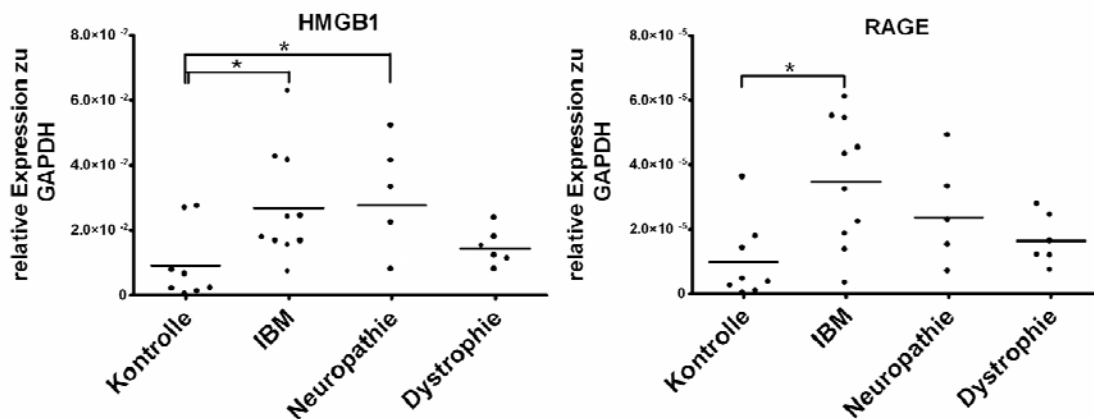


Abb. 4-9: Relative mRNA-Expression von HMGB1 und RAGE: Verwendet wurde Muskelgewebe von Kontrollen mit unauffälliger Muskelbiopsie (n=8), sIBM- (n=10), Neuropathie- (n=6) und Dystrophie-Patienten (n=5). Eine signifikant höhere HMGB1 und RAGE Expression wurde im Gewebe von sIBM-Patienten und für HMGB1 im Gewebe von Neuropathie-Patienten gemessen.

Anhand immunohistochemischer Färbungen wurde die Expression von HMGB1 und RAGE auf Proteinebene untersucht. Doppelfärbungen erfolgten mit Antikörpern gegen β -Amyloid und phosphoryliertes Tau/Neurofilament (P-Tau), um Ko-Lokalisationen dieser Degenerations-Marker zu ermitteln. Hierbei wurde P-Tau durch den Antikörper

SMI-31 dargestellt, der zu etwa 80% an Tubulofilamente vakuolierter Muskefasern und zu einem sehr geringen Teil an nicht-vakuolisierte Fasern im Gewebe von sIBM-Patienten bindet [Mirabella *et al.* 1996]. Insgesamt wurden Gefrierschnitte von 4 sIBM-Patienten im Vergleich zu Kontrollen (n=3), Dystrophie- (n=3) und Neuropathie-Patienten (n=3) gefärbt. Hierbei war im Gewebe gesunder Kontrollen sowie im Gewebe von Dystrophie- und Neuropathie-Patienten eine extrem geringe Anfärbbarkeit für alle untersuchten Marker zu verzeichnen. Im Gewebe der sIBM-Patienten hingegen war eine im Vergleich zum Kontrollgewebe und zum Gewebe nicht-myopathischer Muskelerkrankungen deutlich erhöhte basale Expression von HMGB1 und RAGE zu beobachten und es gab es zum Teil deutlich positive Fasern für die untersuchten Marker (Abb. 4-10).

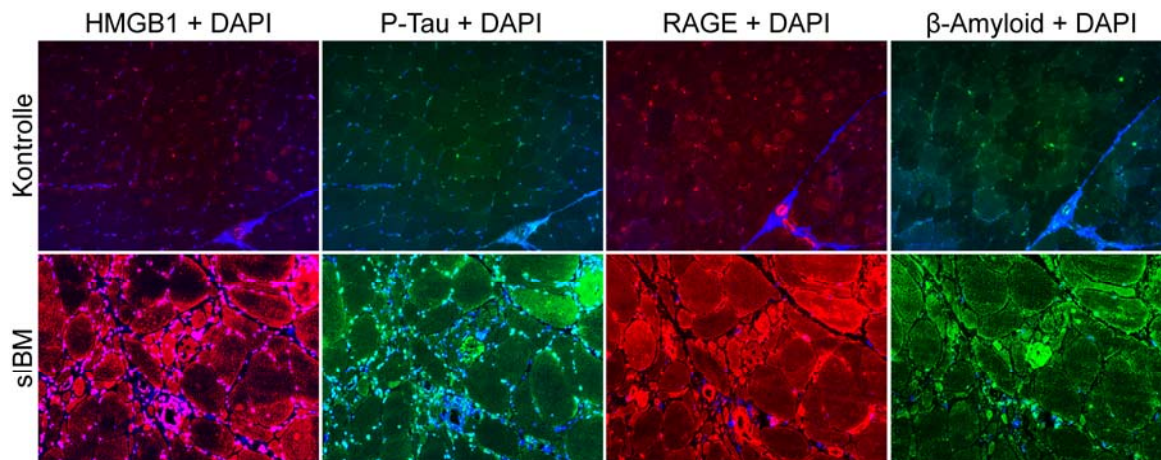


Abb. 4-10: Immunhistochemische Doppelfärbung für Zellstress- und Degenerations-Marker im sIBM-Muskelgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe: Gefärbt wurde für RAGE (rot), HMGB1 (rot), β -Amyloid (grün) und P-Tau (grün). Zellkerngegenfärbungen erfolgten mit DAPI. Die Aufnahmen wurden mit einem 20er Objektiv angefertigt.

In der statistischen Analyse der seriellen immunhistochemischen Färbungen der 4 sIBM-Patienten wurden zwischen 109 und 283 Muskelfasern pro Patient (insgesamt 845 Muskelfasern) bezüglich ihrer Expression der Entzündungs- und Degenerations-Marker untersucht. RAGE-positiv waren $36,2 \pm 8,0\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) aller untersuchten Fasern; positiv für HMGB1 waren $22,7 \pm 6,9\%$. Akkumulationen von β -Amyloid wiesen $22,2 \pm 7,3\%$ aller Muskelfasern auf, wohingegen P-Tau nur in einem geringeren Prozentsatz ($9,4 \pm 2,6\%$) der Fasern zu verzeichnen war (Abb. 4-11).

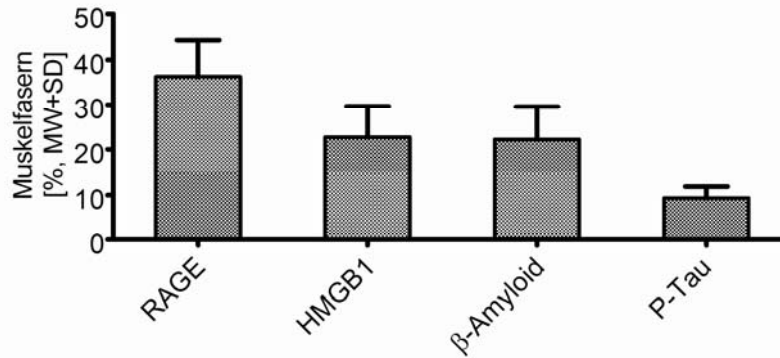


Abb. 4-11: Quantitative Analyse von HMGB1 und RAGE im Vergleich zu Degenerations-Markern: Insgesamt wurden 845 Muskelfasern bezüglich ihrer Expression von RAGE, HMGB1, β -Amyloid und P-Tau im Muskelgewebe von 4 sIBM-Patienten untersucht. (Daten angegeben als Mittelwert + Standardabweichung.)

4.2.2 Assoziation von HMGB1 und RAGE mit β -Amyloid und P-Tau

Der Zusammenhang zwischen der Expression von HMGB1 und RAGE mit den Degenerations-Markern wurde in Form von Ko-Lokalisationen analysiert. Von den RAGE-positiven Fasern waren $35,7 \pm 10,8\%$ ebenfalls positiv für β -Amyloid, $40,5 \pm 15,5\%$ für HMGB1 und $19,4 \pm 13,3\%$ für beide Marker. Ein geringerer Teil war positiv für P-Tau ($11,8 \pm 9,5\%$) (Abb. 4-12; A). Hingegen war RAGE überwiegend in Fasern nachweisbar, die positiv waren für HMGB1 ($65,5 \pm 26,6\%$), β -Amyloid- ($59,0 \pm 15,9\%$) oder P-Tau ($45,9 \pm 33,3\%$) (Abb. 4-12; B-D). Von den HMGB1-positiven Fasern fanden sich in $41,8 \pm 19,2\%$ β -Amyloid-Akkumulationen und $32,1 \pm 24,0\%$ waren doppelt positiv für β -Amyloid und RAGE. P-Tau war zu $27,2 \pm 24,1\%$ in den HMGB1-positiven Fasern vorhanden (Abb. 4-12; B). Von den P-Tau-positiven Fasern waren jedoch $48,4 \pm 32,0\%$ positiv für HMGB1 und $27,6 \pm 22,6\%$ für HMGB1 und RAGE (Abb. 4-12; D). Innerhalb der β -Amyloid-positiven Fasern wiesen $43,8 \pm 20,0\%$ eine erhöhte Expression von HMGB1 auf und $32,0 \pm 20,0\%$ dieser Fasern waren positiv für HMGB1 und RAGE (Abb. 4-12; C).

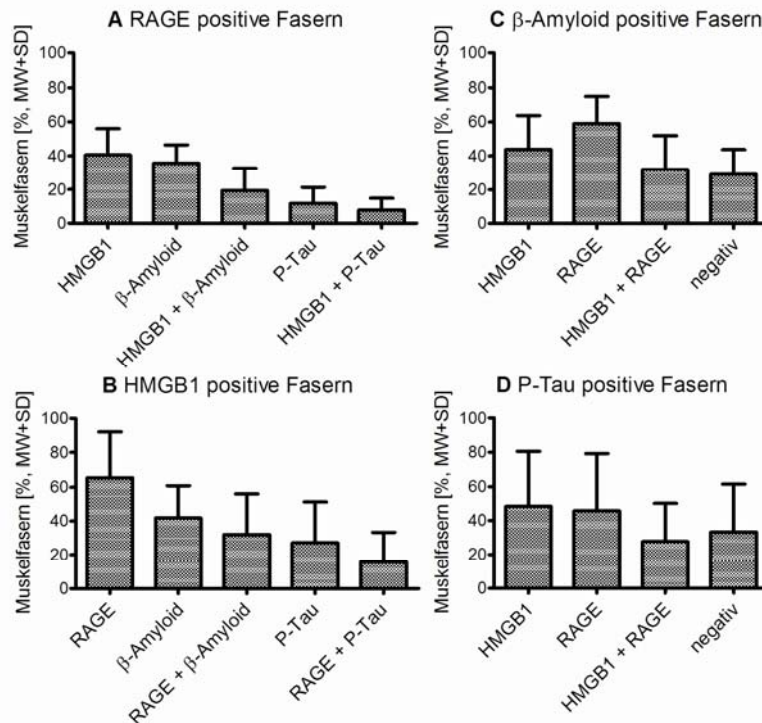


Abb. 4-12: Quantitative Analyse der Ko-Lokalisationen von HMGB1 und RAGE mit Degenerations-Markern: Analyse der Ko-Expressionen der jeweils untersuchten Marker in Fasern positiv für RAGE (A), HMGB1 (B), β -Amyloid (C) und P-Tau (D). (Daten angegeben als Mittelwert + Standardabweichung.)

4.3 Expression von HMGB1 und RAGE in Muskelzellen unter pro-inflammatorischem Zellstress

Eine erhöhte Expression der Entzündungsmarker HMGB1 und RAGE im Skelettmuskel von sIBM-Patienten wurde im vorangegangenen Teil dieser Dissertation demonstriert. Ebenso wurden Ko-Lokalisationen dieser beiden Moleküle mit Degenerations-Markern gezeigt. Diese Ergebnisse untermauern die bereits publizierten Daten über einen Zusammenhang von Entzündung und der Akkumulation von β -Amyloid [Schmidt *et al.* 2008]. Der Mechanismus hierfür ist jedoch unklar. HMGB1 und RAGE induzieren die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine [Steer *et al.* 2006] und könnten somit eine Rolle bei der Interaktion zwischen Entzündung und β -Amyloid-Akkumulation spielen. Mit einem kürzlich etablierten *in-vitro*-Modell für entzündlichen Zellstress in primären Myotubenkulturen aus nicht-pathologischem Muskel [Schmidt *et al.* 2008] sollten mögliche molekulare Interaktionen zwischen pro-inflammatorischem Zellstress und der Expression von HMGB1 und RAGE sowie der Zusammenhang mit β -Amyloid-Akkumulationen untersucht werden. Hierbei wurde ein entzündliches Milieu durch die Exposition der Zellkulturen zu unterschiedlichen Kombinationen der Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF- α geschaffen. Die aufgeführten Experimente wurden, wenn nicht anders

angegeben, mindestens dreimal sowohl an den Myoblasten als auch an nicht-pathologischen primären Myotubenkulturen mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Da die Kultivierung von Primärzellkulturen aufwendig ist, wurde insbesondere für Vorabtestungen und Methodenetablierungen parallel auch mit einer Myoblasten-Zelllinie (Rhabdomyosarkomazellen, CCL136) gearbeitet. Lediglich die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden auf Myoblasten beschränkt, weil diese Untersuchung an ausdifferenzierten und fusionierten Myotuben aus technischen Gründen nicht möglich ist.

4.3.1 mRNA-Expression von HMGB1 und RAGE nach Zytokin-induziertem Zellstress

In Zellkulturexperimenten wurde die Auswirkung von entzündlichem Zellstress auf die Expression von HMGB1 und RAGE untersucht. Hierzu wurden Myoblasten und Myotuben mit verschiedenen Kombinationen der Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF- α für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert und anschließend mittels quantitativer RT-PCR die relative Expression von HMGB1 und RAGE gegenüber GAPDH auf mRNA-Ebene analysiert. Hierbei zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen nach Zytokin-Exposition im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 4-13).

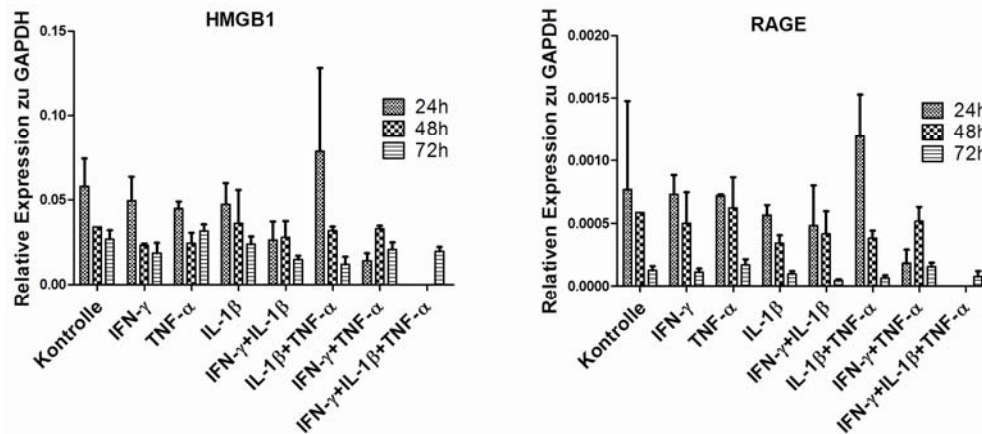


Abb. 4-13: Relative mRNA-Expression von HMGB1 und RAGE in Myotuben: Fusionierte primäre humane Myotuben wurden über die Zeiträume von 24 h, 48 h und 72 h zu Kombinationen der Zytokine IL-1 β (20 ng/ml), IFN- γ (300 U/ml) und TNF- α (10 ng/ml) exponiert. (Daten angegeben als Mittelwert + Standardabweichung.)

4.3.2 Translokation und Überexpression von HMGB1 nach Zytokin-induziertem Zellstress auf Proteinebene

Mittels immunzytochemischer Färbungen wurde die Proteinexpression von HMGB1 in Myotuben und Myoblasten nach Zytokin-Exposition untersucht. Infolge von Zytokin-induziertem Zellstress erfolgte bereits nach 24 h eine Translokation von HMGB1 aus dem Zellkern in das Zytoplasma.

Dieser Effekt war ebenfalls nach 48 h und 72 h nachweisbar, wobei initial das starke Zellkernsignal von HMGB1 ab- und das Signal im Zytoplasma zunahm (Abb. 4-14).

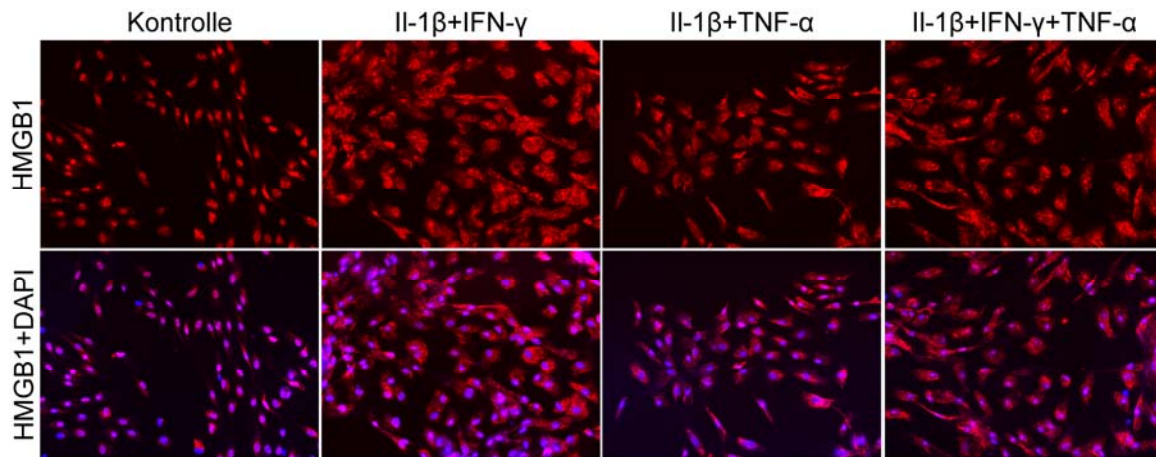


Abb. 4-14: Translokation von HMGB1 in Myotuben nach Zytokin-Exposition: Immunzytochemische Färbung für HMGB1 in humanen Myotuben nach Exposition zu Kombinationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β (20 ng/ml), IFN- γ (300 U/ml) und TNF- α (10 ng/ml) über einen Zeitraum von 72 h. Zellkerngegenfärbung erfolgte mit DAPI. Die Aufnahmen wurden mit einem 20er Objektiv angefertigt.

4.3.3 Sekretion von HMGB1 nach Zytokin-induziertem Zellstress

Neben der Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma war auch eine aktive Freisetzung von HMGB1 in das extrazelluläre Milieu möglich, wie sie von Immunzellen bekannt ist [Gardella *et al.* 2002]. Eine mögliche Sekretion von HMGB1 im Überstand von Zytokin-exponierten Myoblasten und Myotuben wurde mit Hilfe eines ELISA gemessen. Für diese Versuche wurden die Zellkulturen über die Zeiträume von 24 h, 48 h und 72 h mit verschiedenen Kombinationen der Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF- α inkubiert und in dem Überstand die HMGB1-Analyse durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine deutlich gesteigerte Sekretion von HMGB1, insbesondere nach Exposition zu den Zytokin-Kombinationen IFN- γ und IL-1 β , sowie IFN- γ und TNF- α (Abb. 4-15).

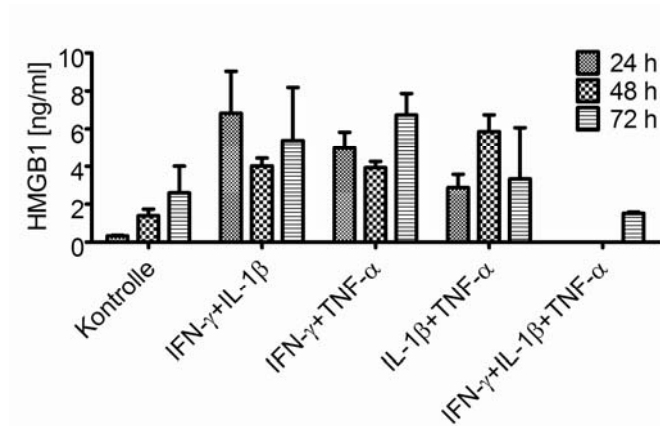


Abb. 4-15: Sekretion von HMGB1 nach Zytokin-Exposition: Exposition von Myotubenkulturen über 24 h, 48 h und 72 h mit Kombinationen von IL-1 β (20 ng/ml), IFN- γ (300 U/ml) und TNF- α (10 ng/ml). Messung der HMGB1 Sekretion mittels ELISA [ng/ml]. (Daten angegeben als Mittelwert + Standardabweichung.)

4.3.4 Hochregulation von RAGE nach Zytokin-induziertem Zellstress

Die Expression von RAGE sowie der Oberflächenrezeptoren MHC-I und MHC-II nach Zytokin-induziertem Zellstress wurde mittels immunzytochemischer Färbungen in Myotuben und Myoblasten auf Proteinebene nach 24 h, 48 h und 72 h analysiert. Hierbei zeigte sich die Überexpression von RAGE, sowie von MHC-I und MHC-II im entzündlichen Milieu (Abb. 4-16).

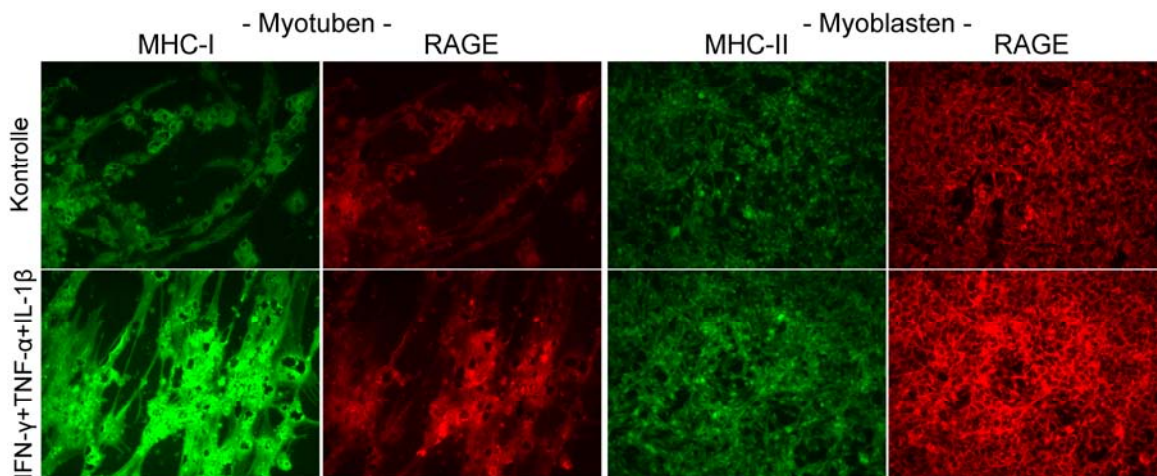


Abb. 4-16: Erhöhte RAGE-Expression nach Zytokin-Exposition: Myotuben und Myoblasten wurden über 48 h zu der Zytokin-Kombination IL-1 β (20 ng/ml), IFN- γ (300 U/ml) und TNF- α (10 ng/ml) exponiert. Gefärbt wurde für RAGE, MHC-I und MHC-II. Die Aufnahmen wurden mit einem 20er Objektiv angefertigt.

Durchflusszytometrische Untersuchungen belegten die Zytokin-bedingte Oberflächenexpression von RAGE nach 48 h und 72 h. Zeitgleich wurde die Zelltodrate durch den Farbstoff 7AAD bestimmt. Diese nahm über die Zeit unter entzündlichen Bedingungen signifikant zu. Hierbei zeigte sich ein Zusammenhang zu der entzündungs-bedingten

Überexpression von RAGE und der Induktion von Zelltod, da sich die doppelt-positive Population fast verdoppelte (Abb.4-17).

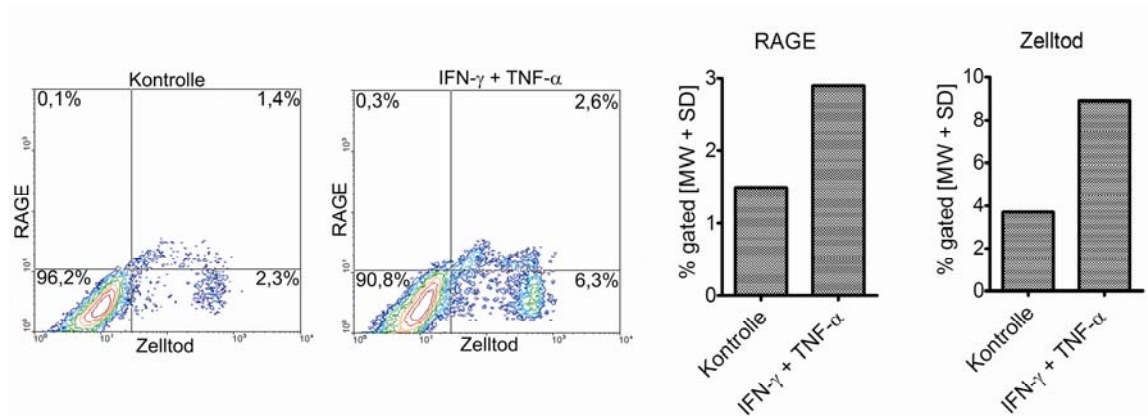


Abb. 4-17: Durchflusszytometrische Analyse der RAGE-Oberflächenexpression in Zusammenhang mit Zelltod: Myoblastenkulturen wurden für 72 h mit IFN- γ (300 U/ml) und TNF- α (10 ng/ml) inkubiert. Die Konturplots (links) zeigen den Anteil der Myoblasten die RAGE-positiv bzw. nicht mehr vital sind. Die quantitative Auswertung (rechts) zeigt den Prozentsatz an RAGE-positiven, toten Myoblasten

4.3.5 Zunahme von Amyloid-Aggregation und Zelltod nach Exposition zu pro-inflammatorischen Zytokinen

In Myotuben wurde gezeigt, dass durch die Zytokine IFN- γ und IL-1 β die Amyloidgenerierung vermehrt wird [Schmidt *et al.* 2008]. Dieser Nachweis ist über eine ThioflavinS Färbung möglich [Bussière *et al.* 2004]. Durch die Exposition zu den pro-inflammatorischen Zytokinen IFN- γ und IL-1 β über einen Zeitraum von 72 h zeigte sich in der quantitativen Grauwertanalyse der Färbungen eine signifikante Zunahme von Amyloid-positiven Proteinaggregaten (**P < 0,001), was mit den bereits publizierten Ergebnissen übereinstimmt. Um die Effekte von HMGB1 auf die Akkumulation von Amyloid zu untersuchen, wurden Myoblasten und Myotuben unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinantem HMGB1 ausgesetzt. Hierbei wurde konzentrationsabhängig eine signifikant gesteigerte Amyloid-Aggregation nachgewiesen (**P < 0,001). Nach Exposition zu rekombinantem HMGB1 mit einer Konzentrationen von 0,3 μ g/ml war das Signal der Amyloid-Aggregation signifikant höher im Vergleich zur Kontrolle, jedoch weniger intensiv als bei einer HMGB1 Konzentration von 1 μ g/ml. (Abb. 4-18). Die Zelltodinduktion durch pro-inflammatorische Zytokine wurde mit rekombinantem HMGB1 in Myotuben und Myoblasten verglichen. Hierbei wurde über einen Zeitraum von 72 h mit IFN- γ und IL-1 β sowie unterschiedliche Konzentrationen an rekombinantem HMGB1 inkubiert. In immunologischen Zelltodanalysen mit dem Farbstoff Propidiumiodid, der ähnlich 7AAD mit der DNA toter Zellen interkaliert, wurde in der quantitativen Grauwertanalyse der Färbung eine signifikante Zunahme an toten Zellen im entzündlichen Milieu gezeigt (**P < 0,01). Ebenfalls fand sich eine konzentrationsabhängige, signifikante Steigerung an Zelltod nach Exposition zu HMGB1: 0,3 μ g/ml (*P < 0,05) und 1 μ g/ml (**P < 0,01) (Abb. 4-18).

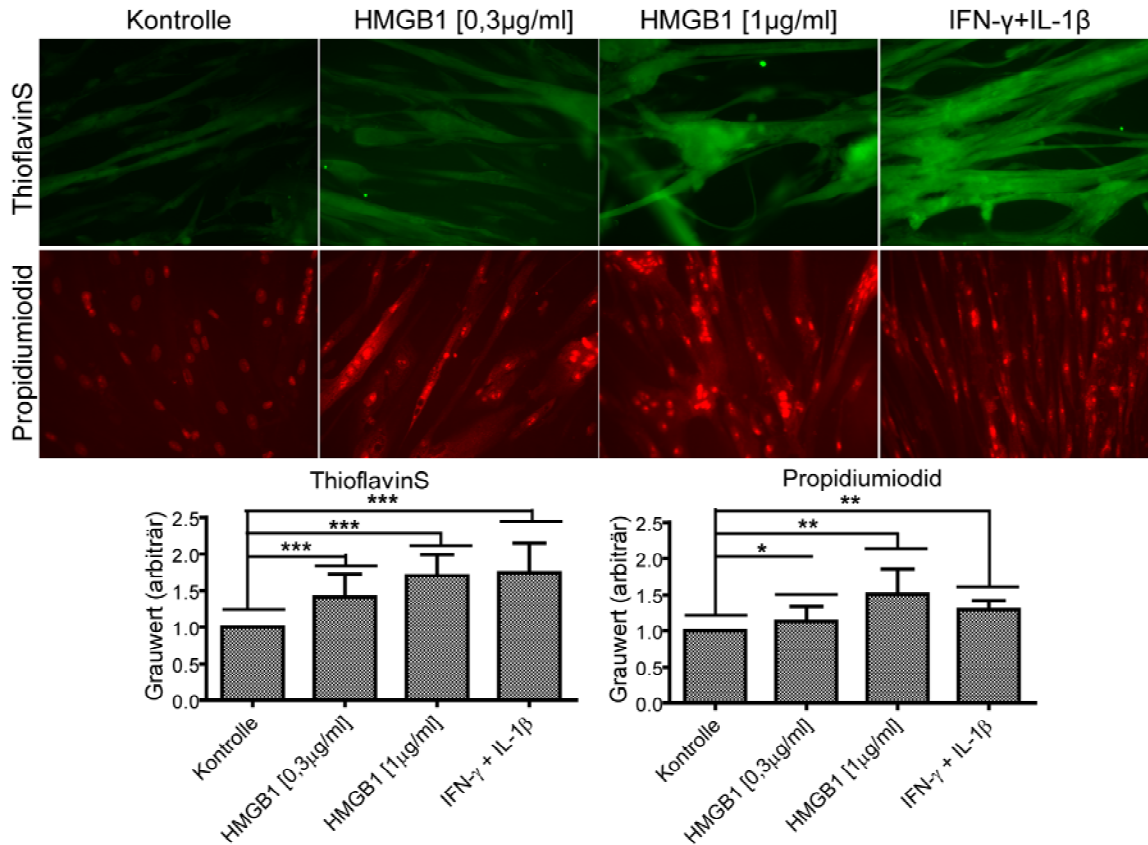


Abb. 4-18: Akkumulation von Amyloid und Zelltodzunahme nach pro-inflammatorischen Zytokinen und rekombinatem HMGB1: Exposition von Myotuben über 72 h zu der Zytokin-Kombination IL-1 β (20 ng/ml) und IFN- γ (300 U/ml), sowie zu rekombinatem HMGB1 (0,3 und 1 μ g/ml). Gefärbt wurde mit ThioflavinS und Propidiumiodid. Die Aufnahmen wurden mit einem 40er Objektiv angefertigt. (Daten angegeben als Mittelwert + Standardabweichung.)

4.3.6 Reduktion der Zytokin-induzierten Amyloid-Aggregatbildung durch den HMGB1-Inhibitor Box A

Mit Hilfe des HMGB1-Inhibitors Box A sollte die Zytokin-induzierte Zellstressreaktion und die damit verbundene Amyloid-Akkumulation reduziert werden. Box A ist ein Peptid mit der Eigenschaft, HMGB1 zu blockieren [Li J *et al.* 2003]. Es wurde direkt nach den Zytokinen und dem rekombinaten HMGB1 auf die Zellkulturen gegeben. Die Aggregation von Amyloid wurde mit ThioflavinS nachgewiesen. Hierbei wurde in der quantitativen Grauwertanalyse die signifikante Abnahme der Amyloid-Akkumulation demonstriert, die durch Inkubation mit rekombinatem HMGB1 (* $P < 0,05$) und insbesondere nach Zytokin-Exposition (***) $P < 0,001$) über den Zeitraum von 72 h induziert worden war (Abb. 4-19).

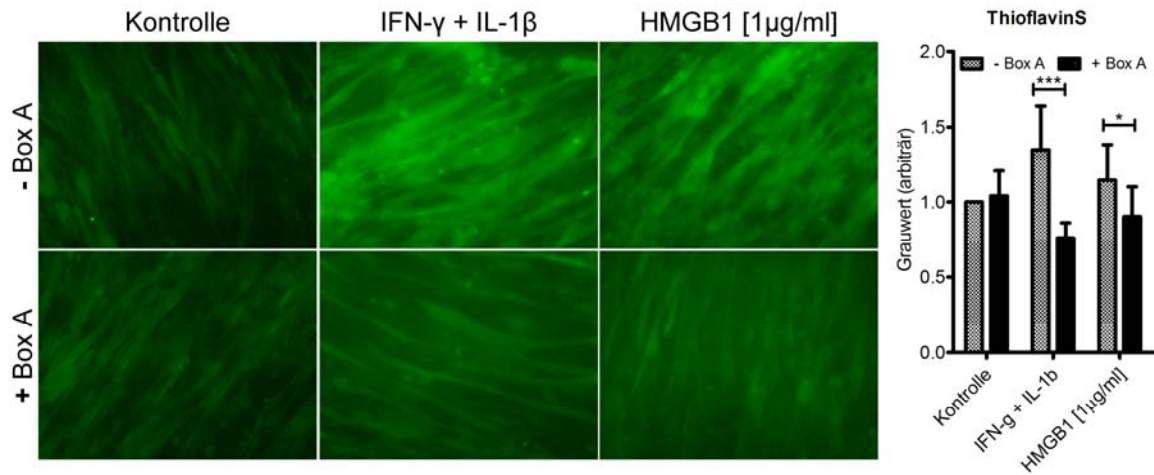


Abb. 4-19: Amyloid-Akkumulation nach Inhibition von HMGB1: Myotuben (n=2) wurden über 72 h zu der Zytokin-Kombination IL-1 β (20 ng/ml) und IFN- γ (300 U/ml), sowie zu rekombinatem HMGB1 (1 μ g/ml) bei zeitgleicher Inhibition mit Box A (10 μ g/ml) exponiert. Gefärbt wurde mit ThioflavinS. Die Aufnahmen wurden mit einem 40er Objektiv angefertigt. (Daten angegeben als Mittelwert + Standardabweichung.)

5 Diskussion

5.1 α B-Crystallin und APP als frühe pathogenetische Marker der sIBM

Bei der sIBM kommt der β -Amyloid-assoziierten Degeneration eine zentrale Bedeutung zu. Darüberhinaus besteht eine ausgeprägte Entzündung im Muskel mit lymphozytärer Infiltration sowie als Ausdruck von Zellstress eine Überexpression des Hitzeschockproteins α B-Crystallin [Banwell und Engel 2000]. Insbesondere in morphologisch unauffälligen Muskelfasern zeigte sich eine Hochregulation von α B-Crystallin, was auf eine Zellstressreaktion im frühen Stadium hindeuten könnte, zumal pro-inflammatorischer Zellstress *in vitro* zu einer Überexpression von α B-Crystallin führt [Muth *et al.* 2009]. Solch ein im sIBM-Muskel vorhandener Zellstress könnte möglicherweise eine chronische Degeneration mit irreversiblen Schäden bei der sIBM mitbedingen.

Um Aufschluss über das Netzwerk molekularer Pathomechanismen im sIBM-Muskel zu erlangen, wurde in dieser Arbeit insbesondere ein möglicher Zusammenhang der Überexpression von α B-Crystallin mit einer Ko-Überexpression von APP, Akkumulation von β -Amyloid sowie entzündlichen Infiltraten in Muskelbiopsien mehrerer sIBM-Patienten untersucht.

Eine positive Korrelation zwischen α B-Crystallin und β -Amyloid-assoziierten Markern konnte in dieser Arbeit demonstriert werden. Viele der normal erscheinenden Muskelfasern zeigten eine Ko-Lokalisation von α B-Crystallin und APP, wohingegen innerhalb aller α B-Crystallin/APP-positiven Fasern auch eine β -Amyloid-Akkumulation und eine Überexpression von Degenerations-/Regenerations-Markern wie NCAM und Desmin gezeigt wurde. Ebenso wurde eine signifikante Ko-Lokalisation zwischen APP/ β -Amyloid und Markern von Zellstress und Regeneration demonstriert.

Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass α B-Crystallin zusammen mit APP einen frühen Indikator einer intrazellulären Zellstressreaktion darstellt. Die Daten sprechen dafür, dass die Akkumulation von β -Amyloid im Skelettmuskel der sIBM der Zellstressreaktion nachfolgt.

Im sIBM-Muskelgewebe wurde α B-Crystallin bereits in normal erscheinenden Muskelfasern demonstriert, welche als „*X-fibres*“ bezeichnet wurden [Banwell und Engel 2000]. Dieses wurde durch die vorliegende Arbeit bestätigt. Die mittlere Prozentzahl α B-Crystallin-positiver Fasern war bei Banwell und Engel [2000] lediglich 9,8 %. Im Vergleich dazu wurde in dieser Arbeit eine etwa doppelt so hohe Prozentzahl α B-Crystallin-positiver Fasern detektiert. Dieses könnte unter anderem dadurch zu erklären sein, dass 5 der 11 sIBM-Patienten bei Banwell und Engel [2000] zum Zeitpunkt der Studie bereits mit Prednisolon mit oder ohne zusätzliche Immunsuppressiva oder Immunmodulatoren behandelt worden waren, wohingegen die Patienten dieser Arbeit zum Zeitpunkt der Biopsie keinerlei Therapie erhalten hatten. Des Weiteren könnte die hier vorliegende gesteigerte Entzündungsrate zu einer Steigerung an α B-Crystallin-positiven Fasern geführt haben. Weiterhin könnte in Bezug auf das schwache Signal von α B-Crystallin, das in nahezu allen Fasern dieser Studie sowie auch bei Banwell und Engel [2000] beschrieben worden ist, ein unterschiedlicher Grenzwert für

„Überexpression“ oder die Verwendung eines anderen Antikörpers zu dieser Diskrepanz geführt haben. Die Grenzwerte für jeden Marker der vorliegenden Arbeit entsprachen zuvor etablierten [Schmidt *et al.* 2008].

Da in α B-Crystallin überexprimierenden Fasern auch Vakuolen, β -Amyloid und Ubiquitin detektiert werden konnte, wurde eine Assoziation von α B-Crystallin mit der Aggregation abberanter Moleküle in sIBM-Patienten angenommen [Banwell und Engel 2000]. Die Relevanz von α B-Crystallin in normal erscheinenden Muskelfasern in Bezug auf die Überexpression von APP und die daraus resultierende Akkumulation von β -Amyloid wurde noch nicht geklärt. Bisher wurde demonstriert, dass *in vitro* die Überexpression von APP eine Hochregulierung von α B-Crystallin induziert [Wojcik *et al.* 2006]. Durch Immunpräzipitation wurde außerdem eine physikalische Assoziation von APP/ β -Amyloid und α B-Crystallin gezeigt, was zu der Annahme führte, dass α B-Crystallin als Antwort auf die intrazelluläre Bildung von β -Amyloid-Oligomeren in noch normal erscheinenden Muskelfasern hochreguliert wird. In seriellen immunhistochemischen Färbungen konnten eine Korrelation und Ko-Lokalisation von α B-Crystallin und APP/ β -Amyloid aufgezeigt werden. Da jedoch APP und α B-Crystallin in normal erscheinenden Muskelfasern ko-überexprimiert werden, kann eine Überexpression von α B-Crystallin nicht ausschließlich als sekundäre Antwort auf eine Hochregulation von APP begründet werden. Es ist möglich, dass eine entzündliche oder eine andere Zellstressreaktion zu der simultanen Hochregulation und Generierung von APP mit Akkumulation von β -Amyloid beiträgt. Diese These wird unterstützt durch die Ko-Lokalisation von MHC-I und α B-Crystallin [Ferrer *et al.* 2004].

Mit Hilfe eines zuvor etablierten *in vitro* Modells der sIBM [Schmidt *et al.* 2008] ließ sich bestätigen, dass pro-inflammatorischer Zellstress die Hochregulierung von α B-Crystallin und APP in den Muskelfasern *in vitro* induziert [Muth *et al.* 2009] und eine nachfolgende Akkumulation von β -Amyloid bewirkt. Eine Assoziation von Protein-Aggregation und α B-Crystallin wurde kürzlich *in vitro* [Wilhelmus *et al.* 2006] und im Skelettmuskel *ex vivo* demonstriert [Ferrer *et al.* 2004]. Darüber hinaus korrelierte die Expression von α B-Crystallin mit weiteren Degenerations- und Regenerations-Markern wie NCAM und Desmin.

Nicht alle der Fasern mit β -Amyloid Ablagerungen zeigten auch eine Überexpression von α B-Crystallin und APP. Dieses kann durch eine reduzierte Kapazität an Zellstressantwort im Endstadium degenerativer Fasern erklärt werden, was ebenfalls für die Interpretation von α B-Crystallin und APP als frühe Marker in der Erkrankung festigt. Die Tatsache, dass einige der Fasern ohne morphologische Veränderungen ebenfalls positiv für NCAM und Desmin waren, spricht für einen frühen Degenerations-/ Regenerations-Prozess, was als weiteres Indiz für eine frühe Zellstressantwort gilt. Eine ähnliche Assoziation zwischen Desmin und α B-Crystallin wurde bereits beschrieben [Fischer *et al.* 2002]. Obwohl mehrere Daten darauf hinweisen, dass der Muskel von sIBM-Patienten eine unterlagerte Eigenschaft zur überschießenden Zellstressantwort unter pro-inflammatorischen Bedingungen besitzen [Schmidt *et al.* 2008], wäre es möglich, dass die hier dargestellten Ergebnisse nicht nur bei der sIBM vorkommen. Aufgrund der Tatsache, dass degenerative Marker wie β -Amyloid und Vakuolen nicht bei der Poly- und Dermatomyositis auftreten, konnte diese multi-parameter Analyse der seriellen Färbungen nur bei der sIBM, nicht aber den Erkrankungskontrollen durchgeführt werden.

Zusammengefasst erweitern diese Daten den Kenntnisstand der zuvor beschriebenen „X-fibers“ im Skelettmuskel der sIBM und untermauern, dass α B-Crystallin Teil einer frühen Zellstressantwort im Skelettmuskel der sIBM ist. Die Ko-Lokalisationen von entzündlichen Reaktionen und α B-Crystallin, zusammen mit der *in vitro* Überexpression von α B-Crystallin nach pro-inflammatorischem Zellstress [Muth *et al.* 2009], unterstützen die Bedeutung der Entzündungsreaktion im sIBM-Muskel. Diese Ergebnisse verbessern das Verständnis der Pathologie der sIBM und zeigen Ansatzpunkte auf für zukünftige diagnostische und therapeutische Strategien.

5.2 Expression von HMGB1 und RAGE im Skelettmuskel der sIBM

Als Pathomechanismus der sIBM konnte eine Interaktion von Entzündung und β -Amyloid-Akkumulation demonstriert werden [Schmidt *et al.* 2008]. Die Grundlage dieser Interaktionen ist jedoch noch unzureichend verstanden. Da HMGB1 und RAGE bei Entzündung ebenso wie bei Zelluntergang eine Rolle spielen und auch im Muskel vorkommen, könnten diese auch an solchen Interaktionen beteiligt sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von HMGB1 und RAGE im Skelettmuskel von sIBM-Patienten untersucht. Hierbei konnte auf mRNA-Ebene eine signifikante Hochregulation von HMGB1 und RAGE im sIBM-Gewebe im Vergleich zum Kontroll-Gewebe detektiert werden, wobei die Expression von HMGB1 auch bei Neuropathie-Patienten signifikant erhöht war. Im Gewebe von Dystrophie-Patienten hingegen konnte keine gesteigerte mRNA-Expression beider Moleküle nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse können auf die unterschiedlichen Pathomechanismen der Erkrankungen zurückzuführen sein. Bei der sIBM spielen im Gegensatz zur Dystrophie möglicherweise auch spezifische Immunmechanismen eine Rolle. Im Gegensatz dazu ist die Neuropathie eine Erkrankung des peripheren Nervens, die vor allem zur Atrophie des Muskelgewebes führt und mit einer vermehrten Regeneration einhergeht. Die Induktion der Expression und die Freisetzung von HMGB1 aufgrund entzündlicher Stimuli [Steer *et al.* 2006] könnte die niedrige Expression im Kontroll- und Dystrophiegewebe erklären sowie die erhöhte Expression bei sIBM- und Neuropathie-Patienten.

Auf Proteinebene war die Expression der beiden Moleküle im sIBM-Gewebe signifikant höher als im Vergleich zum Gewebe gesunder Kontrollen, Neuropathie- und Dystrophie-Patienten. Analog zu der erhöhten Expression von HMGB1 und RAGE im sIBM-Gewebe, wurde auch im Gewebe von Patienten mit Poly- und Dermatomyositis eine erhöhte Expression von HMGB1 und RAGE beschrieben [Ulfgren *et al.* 2004; Haslbeck *et al.* 2005].

Um den Zusammenhang zwischen der Expression von HMGB1 und RAGE mit Degenerations-Markern im sIBM-Gewebe zu analysieren, wurden analog zur vorhergehenden Auswertung Gewebsgefrierschnitte von sIBM-Patienten für HMGB1, RAGE, β -Amyloid und P-Tau in Serie gefärbt und die Expression dieser Marker quantitativ ausgewertet. Hierbei wurden etwa 20% β -Amyloid-positive Muskelfasern gefunden. In einer früheren Studie wurde ein ähnlicher Prozentsatz an β -Amyloid-positiven Muskelfasern detektiert [Schmidt *et al.* 2008]. Etwa 10% der Fasern zeigten auch eine Überexpression von P-Tau, was durch den Antikörper SMI-31, demonstriert wurde. In der vorliegenden Arbeit zeigten etwa 20% der untersuchten Muskelfasern ein

im Vergleich zum umliegenden Gewebe verstärktes Signal von HMGB1. Im Gewebe von Patienten mit Poly- und Dermatomyositis wiesen etwa ein Drittel aller untersuchten Fasern eine erhöhte Expression von HMGB1 auf [Ulfgren *et al.* 2004]. Der Unterschied in der etwas geringeren Expression bei der eigenen Studie könnte unter anderem auf den Gebrauch eines anderen Primärantikörper sowie auf die Definition eines anderen Grenzwertes für positive Fasern zurückzuführen sein. RAGE war in etwa 40% der untersuchten Muskelfasern nachweisbar.

In der Untergruppenanalyse der für jeden Marker positiven Fasern fiel auf, dass RAGE als Rezeptor für HMGB1 [Kokkola *et al.* 2005] und β -Amyloid [Yan *et al.* 1998] nicht immer mit diesen Fasern ko-lokalisierte, was damit zusammenhängen könnte, dass es neben RAGE noch weitere Rezeptoren gibt. Für HMGB1 kommen insbesondere die Toll-Like Rezeptoren 2 und 4 in Frage [Yu *et al.* 2006]. Andererseits war der überwiegende Teil der β -Amyloid-positiven Fasern auch positiv für RAGE. Analog wies der überwiegende Teil der für den Degenerations-Marker P-Tau-positiven Fasern eine erhöhte Expression von RAGE und HMGB1 auf. Da P-Tau hauptsächlich in vakuolisierten Muskelfasern akkumuliert [Mirabella *et al.* 1996], könnte es analog zu β -Amyloid als ein Marker für ein fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung angesehen werden. Die Tatsache, dass nicht alle P-Tau- oder β -Amyloid-positiven Fasern auch eine Überexpression von HMGB1 und RAGE aufwiesen, kann entsprechend Punkt 5.1 durch eine reduzierte Kapazität von Zellstressantworten im Endstadium degenerativer Fasern erklärt werden. In einer Analyse der Expression von RAGE in anderen entzündlichen Muskelerkrankungen wurde hauptsächlich die Expression von RAGE in regenerativen Muskelfasern demonstriert [Haslbeck *et al.* 2005], was ein Indiz für eine frühe Hochregulation sein könnte.

Zusammenfassend konnte erstmals gezeigt werden, dass HMGB1 und RAGE im Gewebe von sIBM-Patienten im Vergleich zu Kontroll-Geweben signifikant überexprimiert werden. Die Ko-Lokalisation mit weiteren Degenerations-Markern legt einen Zusammenhang zwischen Entzündung, Zellstress und Degeneration als pathomechanistisches Netzwerk bei der sIBM nahe. Die vermehrte Ko-Expression von HMGB1 und RAGE innerhalb degenerativer Fasern sowie die im Vergleich dazu geringe Expression der Degenerations-Marker innerhalb der HMGB1- und RAGE-positiven Fasern untermauern zusammen mit der Expression von RAGE in regenerativen Fasern in der Poly- und Dermatomyositis [Haslbeck *et al.* 2005] die Bedeutung von HMGB1 und RAGE bei der Pathogenese der sIBM.

5.3 Interaktionen von pro-inflammatorischem Zellstress, der Expression von HMGB1 und RAGE und der Akkumulation von Amyloid in Muskelzellen

Um die Rolle von HMGB1 und RAGE in der Pathogenese der sIBM weiter zu erörtern, wurde mit einem bereits etablierten *in-vitro*-Modell für entzündlichen Zellstress in primären Myotubenkulturen aus nicht-pathologischem Muskel [Schmidt *et al.* 2008] mögliche molekulare Interaktionen zwischen pro-inflammatorischem Zellstress, der Expression von HMGB1 und RAGE und der Akkumulation von Amyloid untersucht. Dafür wurde entzündlicher Zellstress durch Exposition der Zellkulturen zu

Kombinationen der Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF- α ausgelöst. Diese sind dafür bekannt, die mRNA- und/oder Proteinexpression pro-inflammatorischer Zytokine signifikant zu induzieren [Raju *et al.* 2003; Schmidt *et al.* 2008].

In der vorliegenden Arbeit bedingte das entzündliche Milieu zwar keine Veränderungen in der mRNA-Expression von HMGB1 und RAGE, führte aber bereits nach 24 h zu einer deutlich vermehrten Oberflächenexpression von RAGE auf Myoblasten und Myotuben, sowie zu einer Translokation und Sekretion von HMGB1. Neben Immunzellen [Wang H *et al.* 1999] sind somit auch Muskelzellen in der Lage, infolge von pro-inflammatorischem Zellstress HMGB1 in das extrazelluläre Milieu abzugeben.

Gleichzeitig kam es unter pro-inflammatorischen Bedingungen zu einer signifikanten Zelltodzunahme, insbesondere in den RAGE-positiven Fasern als Ausdruck einer Zellstressreaktion. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit früheren Untersuchungen, in denen demonstriert wurde, dass Zytokine *in vitro* die Zelltodrate erhöhen können [Ankarcrona *et al.* 1994; Abello und Buchman 1994]. Hierbei kommen in Bezug auf RAGE sowohl Apoptose [Burke *et al.* 2004] als auch Nekrose [Haslbeck *et al.* 2005] in Betracht.

Durch Exposition zu rekombinatem HMGB1 über einen Zeitraum von 72 h wurde eine signifikante Zunahme von Zelltod in Muskelzellen nachgewiesen, wobei die Zelltodrate mit einer gesteigerten HMGB1-Konzentration zunahm. Da ausdifferenzierte Myotuben in Kultur als Apoptose-resistent erachtet werden [Wang J und Walsh 1996], ist am ehesten von einem nekrotischen Zelltod auszugehen, was im Einklang mit Daten zur Mitbeteiligung von HMGB1 bei dem Modell der akuten hepatischen Nekrose stände [Scaffidi *et al.* 2002]. Bei dem programmierten Zelltod, der Apoptose, kommt es nur zu einer gering ausgeprägten Entzündungsreaktion und HMGB1 gelangt hierbei nicht in das extrazelluläre Milieu [Scaffidi *et al.* 2002]. Da trotz der Expression Apoptose-assoziiierter Marker [Behrens *et al.* 1997] bei der sIBM und anderen entzündlichen Myopathien hauptsächlich Nekrose für das Zugrundegehen der Muskelfasern verantwortlich ist [Schneider *et al.* 1996], scheint HMGB1 auch hierbei eine Rolle zu spielen.

Der extrazelluläre Effekt von HMGB1 auf die Akkumulation von Amyloid wurde untersucht, indem Myotuben zu verschiedenen Konzentrationen von rekombinatem HMGB1 über einen Zeitraum von 72 h exponiert wurden. Hierbei wurde eine signifikante, von der HMGB1 Konzentration abhängige Amyloid Aggregation nachgewiesen. Dieser Effekt könnte sekundär ausgelöst sein, da HMGB1 die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β induziert, was in Zellkulturen von Immunzellen demonstriert wurde [Wang H *et al.* 1999]. Gleichzeitig verstärkt IL-1 β im Muskelgewebe die Generierung von Amyloid [Schmidt *et al.* 2008]. HMGB1 ist hierbei ein „Trägermolekül“ für andere Zytokine und weist insbesondere zu IL-1 β eine sehr hohe Affinität auf [Sha *et al.* 2008]. Dadurch, dass HMGB1 die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β bewirkt und IL-1 β die HMGB1-Freisetzung stimuliert [Steer *et al.* 2006], kann es zu einer Autoinduktion von IL-1 β und HMGB1 kommen, wodurch die im Muskelgewebe demonstrierte Bildung von Amyloid [Schmidt *et al.* 2008] verstärkt werden kann. Hierbei könnte HMGB1 die Position als einer der zentralen Mediatoren innehaben.

Um diese Schlüsselrolle genauer zu untersuchen, wurde unter pro-inflammatorischen Stimuli HMGB1 blockiert und die Auswirkung auf die Amyloid-Aggregation analysiert. Myotuben wurden hierfür über 72 h zu der Zytokin-Kombination IFN- γ und IL-1 β

exponiert und zeitgleich HMGB1 durch Box A blockiert. Hierbei wurde die pathologische Bildung von Amyloidaggregaten signifikant reduziert. Die erfolgreiche Verwendung des Inhibitors wurde bereits *in vivo* gezeigt: Bei der Endotoxin-verursachten Sepsis in Tier-Modellen wurden die toxischen Eigenschaften von HMGB1 demonstriert und durch die Gabe von Box A erfolgreich Organversagen verhindert [Yang *et al.* 2004]. Ebenfalls wurde der Verlauf experimenteller Arthritis bei Mäusen und Ratten durch Anti-HMGB1-Antikörper oder Box A verbessert [Kokkola *et al.* 2003]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang von Zytokin-induziertem Zellstress auf die Expression von HMGB1 und RAGE in humanen Myotuben und Myoblasten sowie der Zusammenhang beider Moleküle mit Zelltod gezeigt. Eine mögliche Schlüsselrolle von HMGB1 für die Akkumulation von Amyloid könnte vorliegen, da die Inhibition von HMGB1 die sIBM-assoziierten degenerativen Mechanismen im Zellkulturmodell signifikant senkte. Somit könnte die Blockade von HMGB1 ein neuer Ansatzpunkt für die Behandlung der sIBM sein.

6 Zusammenfassung

Die sIBM ist eine chronisch progrediente Muskelerkrankung, deren Pathogenese bisher unzureichend verstanden ist. Neben degenerativen Komponenten wie der Expression von β -Amyloid und seinem Vorläufermolekül APP sind auch inflammatorische Infiltrate im Muskelgewebe von sIBM-Patienten vorhanden. Des Weiteren wurde die Expression des Zellstressmarkers α B-Crystallin in überwiegend normal erscheinenden Muskelfasern beschrieben [Banwell und Engel 2000]. Das Zusammenspiel dieser Pathomechanismen bei der sIBM ist sehr komplex und bisher nur zum Teil verstanden. Dieses Unverständnis trägt auch zu der oft unsicheren Diagnosestellung und zu den geringen therapeutischen Behandlungsoptionen bei.

Ziel des ersten Teiles der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des Hitzeschockproteins α B-Crystallin als Pathomechanismus der sIBM weiter zu untersuchen. Hierzu wurden Serien-Gewebsschnitte von 10 sIBM-Patienten für Degenerations-, Regenerations- und Zellstress-Marker gefärbt. Diese Daten bestätigten die Annahme von Banwell und Engel [2000], dass es sich bei α B-Crystallin um einen früh überexprimierten Marker im Muskelgewebe von sIBM-Patienten handeln kann, und unterstützen die Hypothese einer direkten Assoziation von intrazellulärem Zellstress mit Degeneration und Entzündung. Die Präsenz von α B-Crystallin im Gewebe von sIBM-Patienten in einem Stadium, in dem lichtmikroskopisch noch keine Muskelfaserschädigung nachweisbar ist, weist auf ein mögliches diagnostische Potential dieses Markers hin.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Präsenz von HMGB1 und RAGE im sIBM-Muskelgewebe auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Es wurde erstmalig eine Überexpression beider Moleküle im Gewebe von sIBM-Patienten nachgewiesen. Durch Ko-Lokalisationen mit Degenerations-Markern wurde der Zusammenhang zwischen Entzündung und β -Amyloid-Akkumulation abermals verdeutlicht.

Im dritten Teil wurde anhand eines *in-vitro*-Modells für entzündlichen Zellstress das Zusammenspiel von Zellstress mit Degeneration und Entzündung genauer untersucht. Es wurde gezeigt, dass HMGB1 und RAGE nach Exposition zu pro-inflammatorischen Zytokinen in humanen Myotuben und Myoblasten signifikant überexprimiert und HMGB1 sogar sezerniert wird. Der bisher unbekannt Zusammenhang von HMGB1-Expression und Amyloid-Akkumulation wurde durch die Exposition von humanen Myotuben und Myoblasten zu rekombinantem HMGB1 *in vitro* untersucht. Hierbei wurde eine signifikante Steigerung der Akkumulation von Amyloid demonstriert, die erfolgreich durch Inhibition von HMGB1 reduziert werden konnte. Hierdurch wird ein neuer therapeutischer Ansatzpunkt aufgezeigt, der bei einer chronischen Entzündung im Muskel wie bei der sIBM zum Einsatz kommen könnte.

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse die Bedeutung von Zellstressmolekülen und entzündlichen Mediatoren im Netzwerk molekularer Pathomechanismen der sIBM, auch in einem Stadium der frühen Muskelschädigung. Neben einem Potential für eine verbesserte Diagnostik durch Verwendung dieser Marker stellen die Daten einen möglichen Ansatzpunkt für zukünftige Therapiestrategien dar, z.B. über Blockade von HMGB1 durch Box A.

7 Literaturverzeichnis

Abello PA, Buchman TG (1994): Heat shock-induced cell death in murine microvascular endothelial cells depends on priming with tumor necrosis factor-alpha or interferon-gamma, *Shock*; 2(5):320-3.

Andersson A, Covacu R, Sunnemark D, Danilov AI, Dal Bianco A, Khademi M, Wallström E, Lobell A, Brundin L, Lassmann H, Harris RA (2008): Pivotal advance: HMGB1 expression in active lesions of human and experimental multiple sclerosis, *J Leukoc Biol*; 84(5):1248-55.

Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ (2000): High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes, *J Exp Med*; 192(4):565-70.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Brüne B, Nicotera P (1994): Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production activates apoptosis in pancreatic RINm5F cells, *Exp Cell Res*; 213(1):172-7.

Arahata K, Engel AG (1984): Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells, *Ann Neurol*; 16(2):193-208.

Arnardottir S, Alexanderson H, Lundberg IE, Borg K (2003): Sporadic inclusion body myositis: pilot study on the effects of a home exercise program on muscle function, histopathology and inflammatory reaction, *J Rehabil Med* ;35(1):31-5.

Arnardottir S, Borg K, Ansved T (2004): Sporadic inclusion body myositis: morphology, regeneration, and cytoskeletal structure of muscle fibres, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 75(6):917-20.

Askanas V, Serdaroglu P, Engel WK, Alvarez RB (1991): Immunolocalization of ubiquitin in muscle biopsies of patients with inclusion body myositis and oculopharyngeal muscular dystrophy, *Neurosci Lett*; 130(1):73-6.

Askanas V, Engel WK, Alvarez RB (1993): Enhanced detection of congo-red-positive amyloid deposits in muscle fibers of inclusion body myositis and brain of Alzheimer's disease using fluorescence technique, *Neurology*; 43(6):1265-7.

Askanas V, Engel WK, Bilak M, Alvarez RB, Selkoe DJ (1994): Twisted tubulofilaments of inclusion body myositis muscle resemble paired helical filaments of Alzheimer brain and contain hyperphosphorylated tau, *Am J Pathol*; 144(1):177-87.

Askanas V, McFerrin J, Baqué S, Alvarez RB, Sarkozi E, Engel WK (1996): 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(3):1314-9.

Badrising UA, Maat-Schieman M, van Duinen SG, Breedveld F, van Doorn P, van Engelen B, van den Hoogen F, Hoogendijk J, Höweler C, de Jager A *et al.* (2000): Epidemiology of inclusion body myositis in the Netherlands: a nationwide study, *Neurology*; 55(9):1385-7.

Badrising UA, Maat-Schieman ML, Ferrari MD, Zwinderman AH, Wessels JA, Breedveld FC, van Doorn PA, van Engelen BG, Hoogendijk JE *et al.* (2002):

Comparison of weakness progression in inclusion body myositis during treatment with methotrexate or placebo, *Ann Neurol*; 51(3):369-72.

Banwell BL, Engel AG (2000): AlphaB-crystallin immunolocalization yields new insights into inclusion body myositis, *Neurology*; 54(5):1033-41.

Barohn RJ, Amato AA, Sahenk Z, Kissel JT, Mendell JR (1995): Inclusion body myositis: explanation for poor response to immunosuppressive therapy, *Neurology*; 45(7):1302-4.

Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, Kislinger T, Stern DM, Schmidt AM, De Caterina R (2002): Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses, *Circulation*; 105(7):816-22.

Behrens L, Bender A, Johnson MA, 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):929-38.

Bennardini F, Wrzosek A, Chiesi M (1992): Alpha B-crystallin in cardiac tissue. Association with actin and desmin filaments, *Circ Res*; 71(2):288-94.

Bianchi ME (2004): Significant (re)location: how to use chromatin and/or abundant proteins as messages of life and death, *Trends Cell Biol*; 14(6):287-93.

Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi ME (2003): Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion, *EMBO J*; 22(20):5551-60.

Brezniceanu ML, Völp K, Bösser S, Solbach C, Lichter P, Joos S, Zörnig M (2003): HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma, *FASEB J*; 17(10):1295-7.

Broussard SR, McCusker RH, Novakofski JE, Strle K, Shen WH, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW (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(12):7713-20.

Burke AP, Kolodgie FD, Zieske A, Fowler DR, Weber DK, Varghese PJ, Farb A, Virmani R (2004): Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: a postmortem study, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 24(7):1266-71.

Bussière T, Bard F, Barbour R, Grajeda H, Guido T, Khan K, Schenk D, Games D, Seubert P, 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(3):987-95.

Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtl nder T, Ferrier P, Ferrari S, Bianchi ME (1999): The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice, *Nat Genet*; 22(3):276-80.

Carpenter S, Karpati G, Heller I, Eisen A (1978): Inclusion body myositis: a distinct variety of idiopathic inflammatory myopathy, *Neurology*; 28(1):8-17.

Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, Normark S, Hultgren SJ (2002): Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation, *Science*; 295(5556):851-5.

Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, Nawroth PP (2003): The pattern recognition

receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment, *J Exp Med*; 198(10):1507-15.

Chen ZJ, Parent L, Maniatis T (1996): Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity, *Cell*; 84(6):853-62.

Chou SM (1967): Myxovirus-like structures in a case of human chronic polymyositis, *Science*; 158(807):1453-5.

Dalakas MC, Sonies B, Dambrosia J, Sekul E, Cupler E, Sivakumar K (1997): Treatment of inclusion-body myositis with IVIg: a double-blind, placebo-controlled study, *Neurology*; 48(3):712-6.

Dalakas MC, Rakocevic G, Schmidt J, Salajegheh M, McElroy B, Harris-Love MO, Shrader JA, Levy EW, Dambrosia J, Kampen RL *et al.* (2009): Effect of Alemtuzumab (CAMPATH 1-H) in patients with inclusion-body myositis, *Brain*; 132(Pt 6):1536-44.

Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Müller S, Resnati M, Sanvito F, Arrigoni G, Bianchi ME (2001): The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells, *J Cell Biol*; 152(6):1197-206.

De Mori R, Straino S, Di Carlo A, Mangoni A, Pompilio G, Palumbo R, Bianchi ME, Capogrossi MC, Germani A (2007): Multiple effects of high mobility group box protein 1 in skeletal muscle regeneration, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 27(11):2377-83.

De Paepe B, Creus KK, De Bleecker JL (2008): Chemokines in idiopathic inflammatory myopathies, *Front Biosci*; 13:2548-77.

Du Yan S, Zhu H, Fu J, Yan SF, Roher A, Tourtellotte WW, Rajavashisth T, Chen X, Godman GC, Stern D, Schmidt AM (1997): Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*; 94(10):5296-301.

Emanuele E, D'Angelo A, Tomaino C, Binetti G, Ghidoni R, Politi P, Bernardi L, Maletta R, Bruni AC, Geroldi D (2005): Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia, *Arch Neurol*; 62(11):1734-6.

Emslie-Smith AM, Arahata K, Engel AG (1989): Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies, *Hum Pathol*; 20(3):224-31.

Engel WK, Askanas V (2006): Inclusion-body myositis: clinical, diagnostic, and pathologic aspects, *Neurology*; 66(2 Suppl 1):S20-9. Review.

Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Buzzi MP, Belvito C, Cuccia M, Geroldi D (2005): Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 25(5): 1032-7.

Ferrer I, Martín B, Castaño JG, Lucas JJ, Moreno D, Olivé M (2004): Proteasomal expression, induction of immunoproteasome subunits, and local MHC class I presentation in myofibrillar myopathy and inclusion body myositis, *J Neuropathol Exp Neurol*; 63(5):484-98.

Fischer D, Matten J, Reimann J, Bönnemann C, Schröder R (2002): Expression, localization and functional divergence of alphaB-crystallin and heat shock protein 27 in core myopathies and neurogenic atrophy, *Acta Neuropathol*; 104(3):297-304.

Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, Rubartelli A (2002): The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway, *EMBO Rep*; 3(10):995-1001.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996): A novel method for real time quantitative RT-PCR, *Genome Res*; 6(10):995-1001.

Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, Rosas-Ballina M, Huston JM, Czura CJ, Lee DC, Ward MF, Bruchfeld AN, Wang H *et al.* (2006): Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia, *Shock*; 25(6):571-4.

Goodwin GH, Sanders C, Johns EW (1973): A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids, *Eur J Biochem*; 38(1):14-9.

Griggs RC (2006): The current status of treatment for inclusion-body myositis, *Neurology*; 66(2 Suppl 1):S30-2. Review.

Griggs RC, Askanas V, DiMauro S, Engel A, Karpati G, Mendell JR, Rowland LP (1995): Inclusion body myositis and myopathies, *Ann Neurol*; 38(5):705-13. Review.

Grimm S, Bauer MK, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K (1996): Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis, *J Cell Biol*; 134(1):13-23.

Hardman CH, Broadhurst RW, Raine AR, Grasser KD, Thomas JO, Laue ED (1995): Structure of the A-domain of HMG1 and its interaction with DNA as studied by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy, *Biochemistry*; 34(51):16596-607.

Haslbeck KM, Friess U, Schleicher ED, Bierhaus A, Nawroth PP, Kirchner A, Pauli E, Neundörfer B, Heuss D (2005): The RAGE pathway in inflammatory myopathies and limb girdle muscular dystrophy, *Acta Neuropathol*; 110(3):247-54.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology (N Y)*; 11(9):1026-30.

Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P *et al.* (1999): Schmidt AM: RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides, *Cell*; 97(7):889-901.

Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, *et al.* (1995): The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system, *J Biol Chem*; 270(43):25752-61.

Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H (1999): Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the

cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways, *J Biol Chem*; 274(28):19919-24.

Julien J, Vital C, Vallat JM, Laguény A, Sapina D (1982): Inclusion body myositis. Clinical, biological and ultrastructural study, *J Neurol Sci*; 55(1):15-24.

Kalyan S, Chow AW (2008): Staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 induces the translocation and secretion of high mobility group-1 protein from both activated T cells and monocytes, *Mediators Inflamm*; doi:10.1155/2008/512196 [Epub].

Kim JB, Sig Choi J, Yu YM, Nam K, Piao CS, Kim SW, Lee MH, Han PL, Park JS, Lee JK (2006): HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain, *J Neurosci*; 26(24):6413-21.

Kokkola R, Li J, Sundberg E, Aveberger AC, Palmblad K, Yang H, Tracey KJ, Andersson U, Harris HE (2003): Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity, *Arthritis Rheum*; 48(7):2052-8.

Kokkola R, Andersson A, Mullins G, Ostberg T, Treutiger CJ, Arnold B, Nawroth P, Andersson U, Harris RA, Harris HE (2005): RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages, *Scand J Immunol*; 61(1):1-9.

Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H (1997): Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy, *Proc Natl Acad Sci U S A*; 94(12):6474-9.

Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM (1997): Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress, *J Biol Chem*; 272(28):17810-4.

Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, Yang R, Ochani M, Qiang X, Harris HE, Czura CJ, Wang H, Ulloa L *et al.* (2003): Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1, *Mol Med*; 9(1-2):37-45.

Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, Reid MB (2005): TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle, *FASEB J*; 19(3):362-70.

Libermann TA, Baltimore D (1990): Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor, *Mol Cell Biol*; 10(5):2327-34.

Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, Plachky J, Gröne HJ, Kurschus FC, Schmidt AM *et al.* (2004): Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response, *J Clin Invest*; 113(11):1641-50.

Lindberg C, Trysberg E, Tarkowski A, Oldfors A (2003): Anti-T-lymphocyte globulin treatment in inclusion body myositis: a randomized pilot study, *Neurology*; 61(2):260-2.

Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Kanke T, Sato Y, Hiraga N, Adachi N, Yoshino T, Nishibori M (2007): Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats, *FASEB J*; 21(14):3904-16.

Lotz BP, Engel AG, Nishino H, Stevens JC, Litchy WJ (1989): Inclusion body myositis. Observations in 40 patients, *Brain*; 112 (Pt 3):727-47.

Lünemann JD, Schmidt J, Schmid D, Barthel K, Wrede A, Dalakas MC, Münz C: Beta-amyloid is a substrate of autophagy in sporadic inclusion body myositis, *Ann Neurol*; 61(5):476-83.

Mendell JR, Sahenk Z, Gales T, Paul L (1991): Amyloid filaments in inclusion body myositis. Novel findings provide insight into nature of filaments, *Arch Neurol*; 48(12):1229-34.

Merenmies J, Pihlaskari R, Laitinen J, Wartiovaara J, Rauvala H (1991): 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane, *J Biol Chem*; 266(25):16722-9.

Mirabella M, Alvarez RB, Bilak M, Engel WK, Askanas V (1996): Difference in expression of phosphorylated tau epitopes between sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies, *J Neuropathol Exp Neurol*; 55(7):774-86.

Mitrani-Rosenbaum S, Argov Z, Blumenfeld A, Seidman CE, Seidman JG (1996): Hereditary inclusion body myopathy maps to chromosome 9p1-q1, *Hum Mol Genet*; 5(1):159-163.

Miyata T, Nakano T, Masuzawa M, Katsuoka K, Kamata K (2005): Beta2-microglobulin-induced cutaneous amyloidosis in a patient with long-term hemodialysis, *J Dermatol*; 32(5):410-2.

Montgomery KF, Osborn L, Hession C, Tizard R, Goff D, Vassallo C, Tarr PI, Bomszyk K, Lobb R, Harlan JM, *et al.* (1991): Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 88(15):6523-7.

Müller S, Ronfani L, Bianchi ME (2004): Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function, *J Intern Med*; 255(3):332-43. Review.

Muscle Study Group (2001): Randomized pilot trial of betaINF1a (Avonex) in patients with inclusion body myositis, *Neurology*; 57(9):1566-70.

Muscle Study Group (2004): Randomized pilot trial of high-dose betaINF-1a in patients with inclusion body myositis, *Neurology*; 63(4):718-20.

Muth IE, Barthel K, Bähr M, Dalakas MC, Schmidt J (2009): Pro-inflammatory cell stress in sIBM muscle: overexpression of {alpha}B-crystallin is associated with APP and accumulation of {beta}-amyloid, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; doi: 10.1136/jnnp.2009.174276 [Epub ahead of print].

Needham M, Corbett A, Day T, Christiansen F, Fabian V, Mastaglia FL (2008): Prevalence of sporadic inclusion body myositis and factors contributing to delayed diagnosis, *J Clin Neurosci*; 15(12):1350-3.

Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A (1992): Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins, *J Biol Chem*; 267(21):14998-5004.

Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, Wawrousek EF, O'Connor KC, Hafler DA, Sobel RA, Robinson WH, Steinman L (2007): Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination, *Nature*; 448(7152):474-9.

Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, Cossu G, Bianchi ME (2004): Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation, *J Cell Biol*; 164(3):441-9.

Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E (2004): Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein, *J Biol Chem*; 279(9):7370-7.

Peng A, Koffman BM, Malley JD, Dalakas MC (2000): Disease progression in sporadic inclusion body myositis: observations in 78 patients, *Neurology*; 55(2):296-8.

Popovic K, Ek M, Espinosa A, Padyukov L, Harris HE, Wahren-Herlenius M, Nyberg F (2005): Increased expression of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in skin lesions of patients with lupus erythematosus, *Arthritis Rheum*; 52(11):3639-45.

Porto A, Palumbo R, Pieroni M, Aprigliano G, Chiesa R, Sanvito F, Maseri A, Bianchi ME (2006): Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein, *FASEB J*; 20(14):2565-6.

Pullerits R, Jonsson IM, Verdrengh M, Bokarewa M, Andersson U, Erlandsson-Harris H, Tarkowski A (2003): High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis, *Arthritis Rheum*; 48(6):1693-700.

Prasad S, Thakur MK (1990): Distribution of high mobility group proteins in different tissues of rats during aging, *Biochem Int*; 20(4):687-95.

Raju R, Vasconcelos O, Granger R, Dalakas MC (2003): Expression of IFN-gamma-inducible chemokines in inclusion body myositis, *J Neuroimmunol*; 141(1-2):125-31.

Reeck GR, Isackson PJ, Teller DC (1982): Domain structure in high molecular weight high mobility group nonhistone chromatin proteins, *Nature*; 300(5887):76-8.

Rendon-Mitchell B, Ochani M, Li J, Han J, Wang H, Yang H, Susarla S, Czura C, Mitchell RA, Chen G, Sama AE *et al.* (2003): IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism, *J Immunol*; 170(7):3890-7.

Rong LL, Trojaborg W, Qu W, Kostov K, Yan SD, Gooch C, Szabolcs M, Hays AP, Schmidt AM (2004): Antagonism of RAGE suppresses peripheral nerve regeneration, *FASEB J*; 18(15):1812-7.

Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, Lepäntalo M, Carpén O, Parkkinen J, Rauvala H (2004): Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1), *Blood*; 104(4):1174-82.

Sarkozi E, Askanas V, Johnson SA, Engel WK, Alvarez RB (1993): beta-Amyloid precursor protein mRNA is increased in inclusion-body myositis muscle, *Neuroreport*; 4(6):815-8.

Sasaki N, Takeuchi M, Chowei H, Kikuchi S, Hayashi Y, Nakano N, Ikeda H, Yamagishi S, Kitamoto T, Saito T, Makita Z (2002): Advanced glycation end products (AGE) and their receptor (RAGE) in the brain of patients with Creutzfeldt-Jakob disease with prion plaques, *Neurosci Lett*; 326(2):117-20.

Sayers ME, Chou SM, Calabrese LH (1992): Inclusion body myositis: analysis of 32 cases, *J Rheumatol*; 19(9):1385-9.

Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002): Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation, *Nature*; 418(6894):191-5.

Schmidt J, Barthel K, Wrede A, Salajegheh M, Bähr M, Dalakas MC (2008): Interrelation of inflammation and APP in sIBM: IL-1 beta induces accumulation of beta-amyloid in skeletal muscle, *Brain*; 131(Pt 5):1228-40.

Schneider C, Gold R, Dalakas MC, Schmied M, Lassmann H, Toyka KV, Hartung HP (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(12):1205-9.

Sha Y, Zmijewski J, Xu Z, Abraham E (2008): HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines, *J Immunol*; 180(4):2531-7.

Steer SA, Scarim AL, Chambers KT, Corbett JA (2006): Interleukin-1 stimulates beta-cell necrosis and release of the immunological adjuvant HMGB1, *PLoS Med*; 3(2):e17.

Sugarman MC, Yamasaki TR, Oddo S, Echegoyen JC, Murphy MP, Golde TE, Jannatipour M, Leissring MA, LaFerla FM (2002): Inclusion body myositis-like phenotype induced by transgenic overexpression of beta APP in skeletal muscle, *Proc Natl Acad Sci U S A*; 99(9):6334-9.

Sundén-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Rouhiainen A, Rauvala H, Herman G, Tracey KJ, Lee ML, Andersson J, Tokics L, Treutiger CJ (2005): Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock, *Crit Care Med*; 33(3):564-73.

Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C *et al.* (2000): Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases, *Nature*; 405(6784):354-60.

Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, Fujimori H, Yamamoto Y, Yamamoto H (2000): The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells, *J Biol Chem*; 275(33):25781-90.

Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, Inoue K, Yamada S, Ijiri K, Matsunaga S *et al.* (2003): High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine, *Arthritis Rheum*; 48(4):971-81.

Tews DS, Goebel HH (1996): Cytokine expression profile in idiopathic inflammatory myopathies, *J Neuropathol Exp Neurol*; 55(3):342-7.

Treutiger CJ, Mullins GE, Johansson AS, Rouhiainen A, Rauvala HM, Erlandsson-Harris H, Andersson U, Yang H, Tracey KJ, Andersson J, Palmblad JE (2003): High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium, *J Intern Med*; 254(4):375-85.

Ulfgrén AK, Grundtman C, Borg K, Alexanderson H, Andersson U, Harris HE, Lundberg IE (2004): Down-regulation of the aberrant expression of the inflammation mediator high mobility group box chromosomal protein 1 in muscle tissue of patients with polymyositis and dermatomyositis treated with corticosteroids, *Arthritis Rheum*; 50(5):1586-94.

Ulloa L, Messmer D (2006): High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe, *Cytokine Growth Factor Rev*; 17(3):189-201. Review.

Urbonaviciute V, Fürnrohr BG, Weber C, Haslbeck M, Wilhelm S, Herrmann M, Voll RE (2007): Factors masking HMGB1 in human serum and plasma, *J Leukoc Biol*; 81(1):67-74.

Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I (1997): Immunosuppressive effects of apoptotic cells, *Nature*; 390(6658):350-1.

Walter MC, Lochmüller H, Toepfer M, Schlotter B, Reilich P, Schröder M, Müller-Felber W, Pongratz D (2000): High-dose immunoglobulin therapy in sporadic inclusion body myositis: a double-blind, placebo-controlled study, *J Neurol*; 247(1):22-8.

Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L *et al.* (1999): HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice, *Science*; 285(5425):248-51.

Wang J, Walsh K (1996): Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation, *Science*; 273(5273):359-61

Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yan SD, Brett J, *et al.* (1994): Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications, *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91(16):7742-6.

Wilhelmus MM, Boelens WC, Otte-Höller I, Kamps B, de Waal RM, Verbeek MM (2006): Small heat shock proteins inhibit amyloid-beta protein aggregation and cerebrovascular amyloid-beta protein toxicity, *Brain Res*; 1089(1):67-78.

Wojcik S, Engel WK, McFerrin J, Paciello O, Askanas V (2006): AbetaPP-overexpression and proteasome inhibition increase alphaB-crystallin in cultured human muscle: relevance to inclusion-body myositis, *Neuromuscul Disord*; 16(12):839-44.

Yan SD, Stern D, Kane MD, Kuo YM, Lampert HC, Roher AE (1998): RAGE-Abeta interactions in the pathophysiology of Alzheimer's disease, *Restor Neurol Neurosci*; 12(2-3):167-73.

Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Du H, Roher A, Yu J, Soto C, Schmidt AM, Stern D, Kindy M (2000): Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis, *Nat Med*; 6(6):643-51.

Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, Ulloa L, Wang H, DiRaimo R *et al.* (2004): Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1, *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101(1):296-301.

Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, Fenton MJ, Tracey KJ, Yang H (2006): HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2, *Shock*; 26(2):174-9.

Yunis EJ, Samaha FJ (1971): Inclusion body myositis, *Lab Invest*; 25(3):240-8.

Zimmermann K, Völkel D, Pable S, Lindner T, Kramberger F, Bahrami S, Scheiflinger F (2004): Native versus recombinant high-mobility group B1 proteins: functional activity in vitro, *Inflammation*; 28(4):221-9.

Danksagung

Zum Gelingen meiner Arbeit bin ich vielen Mitmenschen zu Dank verpflichtet, ohne die ich nie so weit gekommen wäre.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Mathias Bähr für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Ein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Dr. med. Jens Schmidt für die Aufnahme in seinen wachsenden Arbeitskreis, die interessante Themenstellung und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. rer. nat. Konstanze Barthel danke ich für ihre stahlharten Nerven, ihre aufopferungsvolle Hilfsbereitschaft und ihre unbeschreibliche Engelsgeduld, mit der sie wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat.

Für exzellente technische Unterstützung danke ich Frau Nicole Tasch und Frau Fatima Agdas.

Herrn Arne Wrede danke ich für die Bereitstellung von Probenmaterial.

Herrn Privatdozent Dr. med. Reinhard Voll danke ich für die Kooperationsbereitschaft hinsichtlich meines HMGB1-ELISA.

All meinen Arbeitskollegen danke ich für die zahlreichen nützlichen Tipps und Hilfestellungen. Besonders die ansteckende gute Laune im Labor waren für mich immer motivierend.

Den fleißigen Korrekturlesern möchte ich danken, dass sie meine Gedanken in die nun vorliegende geordnete und wissenschaftliche Form gebracht haben.

Besonderer Dank gilt meinem Freund Christian Kling, der stets eine passende Antwort auf meine fachlichen Fragen wusste.

Lebenslauf

Mein Name ist Ingrid Elisabeth Muth. Geboren wurde ich am 05. Juni 1984 in Duderstadt, als fünftes Kind des Oberstudienrates i.R. Paul Gerhard Muth und seiner Ehefrau Karin Muth, geborene Röhrich.

Von August 1996 bis Juni 2003 besuchte ich das Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium in Herzberg, wo ich die Allgemeine Hochschulreife erlangte. Ab Juli 2003 erweiterte ich innerhalb von acht Monaten meine Englischkenntnisse an der *Education First (EF) International Language School* in London. Im Dezember 2003 erwarb ich das *Cambridge Certificate in Advanced English*. Seit dem Sommersemester 2004 studiere ich an der Georg-August-Universität in Göttingen Humanmedizin. Zum Ende des Wintersemesters 2005/2006 erhielt ich das Physikum. Im Rahmen meines Praktischen Jahres arbeitete ich in der Zeit von Februar bis Juni 2009 in der kardiologischen Abteilung des Beilinson Hospital's in Tel Aviv, Israel. Diesem folgte ein achtwöchiger Aufenthalt in der Abteilung für Neurologie der Universität von Newcastle upon Tyne mit dem Schwerpunkt auf Muskelerkrankungen. Dieser Aufenthalt wurde durch ein Stipendium der Stiftung Felgenhauer der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) ermöglicht. Im Anschluss daran arbeitete ich in der Abteilung für Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen. Momentan absolviere ich das Chirurgie-Tertial im Evangelischen Krankenhaus Weende in Göttingen.

Seit Juni 2006 bin ich Mitglied der Arbeitsgruppe Muskelimmunbiologie von Dr. Jens Schmidt in der Abteilung für Neurologie. Mein wesentliches Interesse gilt hierbei der Pathogenese der sporadischen Einschlusskörpermyositis (*sporadic Inclusion Body myositis*; sIBM). Das Thema meiner grundlagenwissenschaftlich- und pathogenetisch-orientierten Dissertationsarbeit lautet "Die Expression von *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) und dessen *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) als Pathomechanismus der sporadischen Einschlusskörpermyositis". Teile meiner Forschungsarbeiten durfte ich auf den beiden Kongressen der DGN 2007 und 2008 sowie der *World Muscle Society* (WMS) 2008 in Newcastle upon Tyne, Großbritannien vorstellen. Die Teilnahme an der WMS wurde mir durch ein Stipendium der Stiftung Felgenhauer der DGN ermöglicht und mein Beitrag mit dem Elsevier-Posterpreis ausgezeichnet. Zusätzlich wurde 2009 der erste Teil meiner Arbeiten im „Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry“ veröffentlicht.

Im Zusammenhang mit dieser Dissertation sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Muth IE, Barthel K, Bähr M, Dalakas MC, Schmidt J (2007): Alpha-B Crystallin und Amyloid Precursor Protein als pathogenetische Marker in der sporadischen Einschlusskörperchenmyositis, *Akt Neurol*; 34(S2):164 [Abstract].

Muth IE, Barthel K, Voll R, Trauffeller K, Bähr M, Schmidt J (2008): Zellstress-assoziierte Expression von High Mobility Group Box (HMGB)-1 und dessen Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) im Skelettmuskel der sporadischen Einschlusskörperchenmyositis (sIBM), *Akt Neurol*; 35(S01):65 [Abstract].

Muth IE, Barthel K, Bähr M, Dalakas MC, Schmidt J (2008): Upregulation of α B-crystallin interrelates with APP and precedes accumulation of β -amyloid in the muscle of sporadic Inclusion Body Myositis (sIBM), *Neuromuscul Disord*; 18(9):769 [Abstract].

Muth IE, Barthel K, Bähr M, Dalakas MC, Schmidt J (2009): Pro-inflammatory cell stress in sIBM muscle: overexpression of α B-crystallin is associated with APP and accumulation of β -amyloid, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; doi: 10.1136/jnnp.2009.174276 [Epub ahead of print].