

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

**Pathomechanismen der sporadischen Einschlusskörpermyositis:
molekulare Interaktionen zwischen Autophagie, Zellstress und
Akkumulation von β -Amyloid im Skelettmuskel**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Christian Wolfgang Keller
aus Lahr

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- I. Berichterstatter: PD Dr. med. Schmidt
- II. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thumm
- III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 2012

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die sporadische Einschlusskörpermyositis.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Klinisches Erscheinungsbild.....	1
1.1.3	Diagnose.....	2
1.1.4	Differenzialdiagnose.....	2
1.1.5	Hereditäre Varianten.....	2
1.1.6	Ätiologie und Pathogenese.....	3
1.1.7	Therapie.....	4
1.1.8	Pathomechanismen der sIBM.....	5
1.1.8.1	Entzündliche Pathomechanismen der sIBM.....	5
1.1.8.2	Degenerative Pathomechanismen der sIBM.....	10
1.2	Autophagie.....	14
1.2.1	Molekulare Maschinerie der Makroautophagie.....	15
1.2.2	Regulation der Makroautophagie.....	16
1.2.3	Makroautophagie und Krankheit.....	16
1.2.4	Die Rolle der Makroautophagie bei der sIBM.....	17
1.3	Ziel dieser Arbeit.....	18
2.	Material	20
2.1	Labormaterialien.....	20
2.2	Geräte.....	21
2.3	Chemikalien.....	22
2.4	Puffer.....	25
2.5	Medien.....	26
2.6	Antikörper und Farbstoffe.....	27
2.7	siRNA.....	27
2.8	Primer-Proben.....	28
2.9	Antibiotika.....	28
2.10	Zytokine.....	28
2.11	Längenstandard und Kits.....	29
2.12	Primäre Zellkulturen und Zelllinien.....	29
2.13	Software.....	29

3.	Methoden.....	31
3.1	Zellbiologische Methoden.....	31
3.1.1	Grundlagen der Arbeit mit Zellkulturen.....	31
3.1.2	Kultivierung von adhärenenten Zellen.....	31
3.1.3	Bestimmung von Zellvitalität und Zellzahl.....	32
3.1.4	Gefrierkonservierung von Myoblasten.....	32
3.1.5	Auftauen von Zellen.....	33
3.1.6	Anlegen und Kultivierung der Primärmuskelzellkultur.....	33
3.1.7	Exposition der Myoblasten gegenüber proinflammatorischen Zytokinen.....	33
3.1.8	Exposition von Myoblasten gegenüber Inhibitoren/Induktoren...	34
3.2	Immunbiologische Methoden.....	34
3.2.1	Immunzytochemie.....	34
3.2.1.1	Fixierung.....	35
3.2.1.2	Permeabilisierung.....	35
3.2.1.3	Blockierung.....	36
3.2.1.4	Immunzytochemische Färbung mittels Maus Anti-LC3- Antikörper.....	35
3.2.1.5	ThioflavinS.....	36
3.2.1.6	Fluoreszenzmikroskopische Analyse.....	37
3.2.2	Proteinnachweis mittels Immunoblot.....	37
3.2.2.1	Zellyse zur Proteingewinnung.....	37
3.2.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	38
3.2.2.3	Auftrennung von Proteinen über SDS-Gelelektrophorese.....	38
3.2.2.4	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	40
3.2.2.5	Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulosemembranen.....	40
3.2.2.6	Immunchemischer Nachweis der Proteine.....	40
3.2.2.7	Entfernen der Antikörper von der Nitrozellulosemembran (Strippen) mit anschließender Re-Immundetektion.....	41
3.2.3	Durchflusszytometrie.....	42
3.2.3.1	Quantifizierung der spezifischen DNA-Fragmentation.....	43
3.2.3.2	Durchflusszytometrische Analyse der MHC-Klasse-I- und -II- Expression.....	44
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	45

3.3.1	Spezifischer <i>knock down</i> durch Transfektion von <i>small interfering RNA</i> in humanen Myoblasten.....	45
3.3.2	mRNA-Analyse mittels quantitativer reverse-Transkription-PCR	46
3.3.2.1	RNA-Aufreinigung.....	46
3.3.2.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	47
3.3.2.3	cDNA-Synthese/reverse Transkription.....	47
3.3.2.4	Quantitative Real Time-PCR.....	48
4.	Ergebnisse	50
4.1	Makroautophagie ist ein konstitutiv aktiver Prozess in humanen Skelettmuskelzellen.....	50
4.2	Hochregulation von Makroautophagie durch Rapamycin in Skelettmuskelzellen.....	53
4.3	Zytokin-vermittelte Regulation von Makroautophagie in Myoblasten.....	54
4.3.1	Inflammatorische Moleküle in Überständen Monozyten-abgeleiteter DCs.....	55
4.3.2	TNF- α moduliert die LC3-Expression in Myoblasten.....	55
4.4	Makroautophagie moduliert nicht die Suszeptibilität von Myoblasten gegenüber TNF- α -induziertem Zelltod.....	59
4.5	TNF- α reguliert die MHC-Expression in Myoblasten nach Inkubation mit INF- γ	61
4.6	Modulation der Degradation von APP und β -Amyloid durch TNF- α -medierte Induktion von Makroautophagie.....	67
5.	Diskussion	71
5.1	Einleitung.....	71
5.2	Makroautophagie als konstitutiv aktiver Prozess in humanen Skelettmuskelzellen.....	71
5.3	Zytokin-vermittelte Regulation von Makroautophagie in Sklettmuskelzellen.....	72
5.4	Makroautophagie und TNF- α -vermittelter Zelltod.....	73
5.5	TNF- α -vermittelte Regulation der MHC-Expression in humanen Skelettmuskelzellen.....	73
5.6	Modulation der Degradation von APP und β -Amyloid durch	

	TNF- α -medierte Induktion von Makroautophagie	75
5.7	Schlussfolgerung.....	78
6.	Zusammenfassung.....	80
7.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	81
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	81
7.2	Tabellenverzeichnis.....	82
8.	Literaturverzeichnis.....	84

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
×	mal
α	<i>alpha</i>
Abb.	Abbildung
AIC	engl. <i>autophagy initiation complex</i> (Autophagie-Initiationskomplex)
AICD	engl. <i>intracellular domain fragment of APP</i> (intrazelluläre Domäne Fragment des APP)
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
APPsβ	sezernierte APP-Ektodomäne
APS	Ammoniumpersulfat
ATG	engl. <i>autophagy-related gene</i>
β	<i>beta</i>
β-CTF	engl. <i>C-terminal fragment</i> (auch: C99)
BACE	engl. <i>beta-site of APP-cleaving enzyme</i> (β-Sekretase)
BDCA	engl. <i>blood dendritic cell antigen</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Kohlenstoff
C99	membrangebundenes C-terminales Fragment von APP (auch: β-CTF)
ca.	circa
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
°C	Grad Celcius
CHX	Cycloheximid
CIITA	MHC-Klasse-II-Transaktivator
cm	Zentimeter
CMA	engl. <i>chaperone-mediated autophagy</i> (Chaperon-vermittelte Autophagie)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cytochrom-C-Oxidase
CQ	Chloroquin
CXC-L	CXC-Ligand
d	destilliert
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Δ	<i>delta</i>
DCs	engl. <i>dendritic cells</i> (dendritische Zellen)
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
dT	Desoxythymidin
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym

EBNA	EBV-spezifisches nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	engl. <i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	lat. <i>et alii</i> (und andere)
etc.	lat. <i>et cetera</i> (und so weiter)
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter (Durchflusszytometer)
Fc	engl. <i>fragment, crystallizable</i>
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoreszenzisothiocyanat
FSC	engl. <i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	Zentralbeschleunigung, Gramm
γ	<i>gamma</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	engl. <i>green fluorescence protein</i>
GM-CSF	engl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
hIBM	hereditäre Einschlusskörpermyositis
HLA	humanes Leukozytenantigensystem
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSP	Hitzeschockprotein
HSV	Herpes-simplex-Virus
IBM	engl. <i>inclusion body myositis</i> (Einschlusskörpermyositis)
IBMPFD	engl. <i>inclusion body myopathy associated with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia</i>
ICAM	engl. <i>intercellular adhesion molecule</i>
ICOS	engl. <i>inducible CO-stimulator</i>
ICOS-L	engl. <i>ICOS-ligand</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
IP10	engl. <i>interferon-gamma-inducible protein-10</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IVIG	intravenöse Immunglobuline
JNK	c-jun N-terminale Kinasen
kDa	kiloDalton
l	Liter
LC3	engl. <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
LFA	engl. <i>lymphocyte function-associated antigen</i>
LGMD	engl. <i>limb-girdle muscular dystrophy</i> (Gliederergürtelmuskeldystrophie)
m	Meter, milli

M	Molar
3-MA	3-Methyladenin
MACS	engl. <i>magnetic-activated cell sorting</i>
MIIC	Beladungskompartimente der MHC-Klasse-II-Moleküle
MCK	engl. <i>muscle creatin kinase</i>
MCP-1	engl. <i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i>
μ	mikro
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
mtDNA	engl. <i>mitochondrial DNA</i>
mTOR	engl. <i>mammalian target of rapamycin</i>
n	Anzahl der Messwerte
N	Stickstoff
NFκB	engl. <i>nuklear factor kappaB</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PBSS	Saponin in PBS
PCD	engl. <i>programmed cell death</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	lat. <i>potentia hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)
PHA	Polyhämagglutinin
PI	Proteaseinhibitor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase-Komplex
PS	Presenilin
RAP	Rapamycin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
Rox	Carboxy-X-Rhodamin
RPM	engl. <i>revolutions per minute</i>
RT	reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (Maßeinheit für den Sedimentationskoeffizienten)

SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek	Sekunde(n)
sIBM	sporadische Einschlusskörpermyositis
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i>
SPM	skapulooperoneale Myopathie
SSC	engl. <i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TBS	engl. <i>tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TEMED	NNN'N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	engl. <i>transforming growth factor</i>
TLR	engl. <i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R	TNF-Rezeptor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	engl. <i>units</i> (Einheit der Enzymkapazität)
u.a.	unter anderem
UPS	Ubiquitin-Proteasomen-System
V	Volt
VCAM	engl. <i>vascular adhesion molecule</i>
VCP	engl. <i>valosin-containing protein</i>
vgl.	vergleiche
VLA	engl. <i>very late antigen</i>
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Die sporadische Einschlusskörpermyositis

Die sporadische Einschlusskörpermyositis (engl. *sporadic inclusion body myositis*, Abk. sIBM) ist eine chronisch-progrediente entzündliche Muskelerkrankung und gehört neben der Polymyositis, der Dermatomyositis sowie der nekrotisierenden Myopathie zu den inflammatorischen Myopathien (AMATO und BAROHN 2009, DALAKAS 1991).

1.1.1 Epidemiologie

Obwohl die sIBM mit einer Prävalenz von ca. fünf bis zehn Erkrankten pro eine Million Menschen zu den eher seltenen Erkrankungen zu rechnen ist, handelt es sich bei der Entität um die häufigste erworbene Myopathie bei über 50jährigen mit einer Prävalenz von ca. 35 Betroffenen pro eine Million Menschen in dieser Untergruppe. In etwa drei Vierteln der Fälle sind Männer von der Erkrankung betroffen (DALAKAS 2006). Nach ihrer Erstbeschreibung im Jahre 1967 (CHOU 1967) als eine Form der chronischen Polymyositis mit intranukleären und zytoplasmatischen, filamentösen Einschlüssen sowie ihrer Bezeichnung als *Einschlusskörpermyositis* seit 1971 (YUNIS und SAMAHA 1971) gilt die Erkrankung heute als die wichtigste altersassoziierte Muskelerkrankung (NEEDHAM und MASTAGLIA 2008).

1.1.2 Klinisches Erscheinungsbild

Klinisch präsentiert sich die Erkrankung mit progredienter Muskelschwäche, einer asymmetrischen Atrophie der distalen und proximalen Muskulatur sowie einer Prädominanz der unteren Extremität. Initial findet sich hierbei häufig ein Befall des Musculus quadriceps femoris und der tiefen Fingerbeuger (AMATO et al. 1996). Dies führt im weiteren Krankheitsverlauf oft zu Stürzen sowie einer eingeschränkten Ausübung feinmotorischer Tätigkeiten. Ein einseitiges Befallsmuster ist möglich. Die Häufigkeit des Auftretens von Sensibilitätsstörungen lässt sich oft nur ungenügend objektivieren, wird aber in bis zu 14 % der Fälle angegeben. Auch leidet nahezu die Hälfte der Betroffenen unter Myalgien (BEYENBURG et al. 1994). In bis zu 60 % der Fälle kommt es durch eine Funktionsstörung des Musculus cricopharyngeus außerdem zum Auftreten einer progredienten Dysphagie (DALAKAS 2006). Wenngleich in der Vergangenheit eine Komorbidität mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen postuliert wurde, konnte eine entsprechende Assoziation der sIBM mit kardiovaskulären Affektionen nicht abschließend geklärt werden (COX et al. 2009). Die Geschwindigkeit der Progression korreliert positiv mit dem Alter bei Manifestation der Erkrankung (DALAKAS 2006). Dem chronisch-progredienten Verlauf der sIBM ist es geschuldet, dass die meisten Patienten aufgrund der ausgeprägten Myatrophie innerhalb

von fünf bis zehn Jahren entweder eine Gehhilfe benötigen oder rollstuhlpflichtig werden (PENG et al. 2000).

1.1.3 Diagnose

Neben einem ausführlichen Arzt-Patienten-Gespräch unter Berücksichtigung der Familienanamnese sowie einer umfassenden klinisch-neurologischen Untersuchung kommen der Labordiagnostik und elektrophysiologischen Untersuchungen eine Bedeutung bei der Diagnosestellung zu. Wegweisend ist letztendlich die Muskelbiopsie mit konsekutiver histologischer Aufarbeitung (DALAKAS 2007).

1.1.4 Differenzialdiagnose

Differenzialdiagnostisch muss neben den klassischen inflammatorischen Myopathien und Muskeldystrophien insbesondere im Anfangsstadium der Erkrankung auch an die Amyotrophe Lateralsklerose (Abk. ALS) gedacht werden (SCHELLENBERG et al. 2010). Neben selteneren Differenzialdiagnosen wie der okulopharyngealen Muskeldystrophie oder der Desminspeichermyopathie können sich auch Formen der Polyneuropathie klinisch ähnlich präsentieren. Des Weiteren gilt es, die skapuloperoneale Myopathie (Abk. SPM), welche sich überwiegend in der peronealen Muskulatur und im Schultergürtel manifestiert, sowie die Gliedergürtelmuskeldystrophien (engl. *limb-girdle muscular dystrophies*, Abk. LGMD) mit progredienter Schwäche der Schultergürtel- und Beckenmuskulatur gegenüber der sIBM abzugrenzen.

1.1.5 Hereditäre Varianten

Neben der sporadischen Form finden sich auch nicht-entzündliche erbliche Varianten, die unter der Gruppe der hereditären Einschlusskörpermyopathien (engl. *hereditary inclusion body myopathy*, Abk. hIBM) subsumiert werden. Ausgewählte Beispiele hierfür sind die autosomal-rezessive hIBM2 mit einer Mutation im GNE-Gen (UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase/N-Acetylmannosaminase) (EISENBERG et al. 2001) oder die autosomal-dominante IBMPFD (engl. *inclusion body myopathy associated with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia*), bei welcher eine Mutation im VCP (engl. *valosin-containing protein*)-Gen beschrieben wurde (WATTS et al. 2004). Wenngleich die hIBM insgesamt eine sehr seltene Gruppe von Erbkrankheiten darstellt, sind bestimmte Varianten in einer Subpopulation von persischen Juden mit einer Prävalenz von 1 : 1500 doch weit verbreitet (ARGOV et al. 1998). Den hereditären Einschlusskörpermyopathien kann sowohl ein autosomal-dominanter als auch ein autosomal-rezessiver Erbgang zugrunde liegen. Klinisch zeigt sich im Unterschied zu der sIBM allenfalls erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung ein Befall des Musculus quadriceps femoris. Ophthalmoplegien sind möglich.

Weiterhin zeichnen sich die erblichen Varianten durch ein Auftreten bereits im frühen Erwachsenenalter sowie eine familiäre Häufung aus (MITRANI-ROSENBAUM et al. 1996).

1.1.6 Ätiologie und Pathogenese

Bis heute ist die genaue Ursache der Erkrankung unklar und das Zusammenspiel der zugrundeliegenden Pathomechanismen nur unzureichend verstanden. Die Pathogenese der Erkrankung ist charakterisiert durch das parallele Auftreten von inflammatorischen und degenerativen Prozessen im Skelettmuskel der Betroffenen. Die histopathologischen Kennzeichen der Erkrankung umfassen Entzündung des Endomysiums, Kaliberschwankungen der Muskelfasergröße, zentrale Zellkerne und fibrotische Umbauprozesse (DALAKAS und SIVAKUMAR 1996). Nur ein geringer Anteil der Muskelfasern zeigt nekrotische Veränderungen. Hinsichtlich der inflammatorischen Veränderungen innerhalb des Muskels finden sich multifokale lymphozytäre Infiltrate (MUNTZING et al. 2003) sowie eine Überexpression des Haupthistokompatibilitäts-Komplex (engl. *major histocompatibility complex*, Abk. MHC)-Klasse-I-Moleküls an der Oberfläche der Muskelfasern (WIENDL et al. 2005). Die hauptsächlich aus zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen bestehenden Infiltrate expandieren klonal und invadieren vornehmlich nicht-nekrotische Muskelfasern, welche MHC-Klasse I überexprimieren (GRIGGS et al. 1995). Neben lymphozytären Zellinfiltraten lassen sich des Weiteren myeloide dendritische Zellen (engl. *dendritic cells*, Abk. DCs) identifizieren, welche sich analog zu den zytotoxischen T-Zellen in enger räumlicher Nähe zu den nicht-nekrotischen Muskelfasern aufhalten und möglicherweise eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen spielen (GREENBERG et al. 2007). Die degenerativen Veränderungen innerhalb des Muskels umfassen das Auftreten von 2 - 25 µm großen lysosomalen Vakuolen (engl. *rimmed vacuoles*), Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins (engl. *amyloid precursor protein*, Abk. APP) sowie intrazellulären filamentösen Einschlüssen mit Akkumulation von Degenerationsmolekülen wie beispielsweise Kongorot-positivem β-Amyloid (MENDELL et al. 1991), α-Synuclein (ASKANAS et al. 2000) oder phosphoryliertem Tau (ASKANAS et al. 1994). Obwohl die namensgebenden Vakuolen der sIBM keinesfalls spezifisch für die Erkrankung sind und beispielsweise auch bei myofibrillären Myopathien oder der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie vorkommen, finden sich die Vakuolen bei der sIBM charakteristischerweise nahezu ausschließlich in Muskelfasern, die einerseits MHC-Klasse-I-Moleküle überexprimieren, bei welchen andererseits aber keine lymphozytären Infiltrate vorliegen (DALAKAS 2006).

Mehr als die Hälfte der Patienten zeigt darüber hinaus auch mitochondriale Veränderungen. Wegweisend hierbei sind strukturell abnorme Mitochondrien, eine signifikante Häufung von Deletionen mitochondrialer DNA (Abk. mtDNA) im Vergleich zu

Kontrollmuskeln sowie zahlreiche Cytochrom-C-Oxidase (Abk. COX)-defiziente Muskelfasern (OLDFORS et al. 2006). Letztere dienen neben dem Nachweis kongophiler Ablagerungen und einer Überexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen der histologischen Diagnose der sIBM (DALAKAS 2006).

Die Pathogenese der sIBM ist vermutlich geprägt durch komplexe Interaktionen zwischen natürlichem Alterungsprozess, Umweltfaktoren, genetischer Prädisposition und immunologischer Fehlregulation. Zwillingsstudien legen nahe, dass das Vorhandensein bestimmter genetischer Haplotypen zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber einer Erkrankung an sIBM führen können (AMATO und SHEBERT 1998). Hierbei spielen vor allem Assoziationen mit bestimmten Allelen des humanen Leukozyten-Antigen (Abk. HLA)-Systems eine wichtige Rolle (PRICE et al. 2004). Auch vorbeschriebene Assoziationen der Erkrankung mit verschiedenen viralen Infektionen (CUPLER et al. 1996) verdeutlichen das Vorliegen eines komplizierten Zusammenspiels zahlreicher Kofaktoren.

1.1.7 Therapie

Derzeit steht keine effektive Behandlung der sIBM zur Verfügung. Trotz der Beteiligung immunologischer Faktoren an der Pathogenese der Erkrankung ist diese weitestgehend resistent gegenüber immuntherapeutischen Behandlungsstrategien. Obwohl es bei einzelnen Patienten zu kurzzeitigem Ansprechen der Therapie kommt, kann die Behandlung mit immunsuppressiven Substanzen wie beispielweise Azathioprin oder Methotrexat zu keiner langfristigen Verbesserung führen. Nur wenige Patienten profitierten von einer Therapie mit Kortikosteroiden oder dem Immunsuppressivum Mycophenolat-Mofetil und gaben an, sich subjektiv schwächer zu fühlen, sobald diese Therapien ausgesetzt wurden (DALAKAS 2003). Auch die Gabe intravenöser Immunglobuline (Abk. IVIGs) führte nur bei einzelnen Patienten zu einer vorübergehenden Verbesserung der Muskelkraft (AMATO et al. 1994). Eine Studie zur Wirksamkeit einer hochdosierten Gabe des Immunmodulators Interferon-beta-1a zeigte keine Verbesserung hinsichtlich der Muskelkraft gegenüber der Placebogruppe (TAWIL et al. 2004). Alemtuzumab, ein Anti-CD52-Antikörper zur Depletion peripherer Lymphozyten, wirkte sich günstig auf die Krankheitsprogression aus und führte zu einer Verbesserung der Kraftgrade einzelner Patienten. Allerdings ist der Antikörper aufgrund seines ausgeprägten Nebenwirkungsspektrums nur eingeschränkt einsetzbar (DALAKAS et al. 2009). Neben pharmakologischen Therapieansätzen komplettieren physiotherapeutische Maßnahmen das derzeitige Behandlungskonzept (ARNARDOTTIR et al. 2004).

Möglicherweise ist das fehlende Ansprechen der Patienten auf immunsuppressive bzw. -modulatorische Behandlungskonzepte dem langsamen chronisch-progressiven Krankheitsverlauf geschuldet. Zum Zeitpunkt einer ersten subjektiv wahrnehmbaren

Manifestation der Erkrankung wurden unter Umständen die an der Pathogenese beteiligten irreversiblen degenerativen Mechanismen bereits initialisiert. Ein umfassenderes Verständnis der Interaktionen aller zugrundeliegenden Pathomechanismen sowie eine Identifizierung zuverlässiger Frühmarker sind daher für die Entwicklung effizienter Behandlungskonzepte der sIBM von großer Bedeutung.

1.1.8 Pathomechanismen der sIBM

Das komplizierte Zusammenspiel der verschiedenen Pathomechanismen der sIBM ist bisher nur unzureichend verstanden. Die Hauptmerkmale dieser komplexen Muskelerkrankung sind das simultane Vorliegen entzündlicher sowie degenerativer Prozesse innerhalb des Muskels. Ob diese Mechanismen miteinander interagieren oder isoliert voneinander vorliegen, ist jedoch weitgehend unklar. Auch konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, inwieweit sich die im erkrankten Muskel ablaufenden Prozesse der Degeneration und Entzündung gegenseitig bedingen, welche Vorgänge letztlich ursächlich zugrundeliegen und ob sich mögliche Schnittstellen als therapeutische Ansatzpunkte eignen. Nachfolgend sollen die beiden krankheitsunterhaltenden Hauptmechanismen der sIBM näher beleuchtet werden.

1.1.8.1 Entzündliche Pathomechanismen der sIBM

Mittlerweile liegen zahlreiche Beobachtungen vor, welche auf eine immunpathologische Komponente der sIBM hinweisen. In der Vergangenheit konnte aufgrund epidemiologischer Daten bereits gezeigt werden, dass Assoziationen der sIBM mit Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise der Multiplen Sklerose, der Rheumatoiden Arthritis (BADRISING et al. 2004) und dem Antikörpermangelsyndrom (DALAKAS 1995) vorliegen. Weiterhin konnten bei Patienten mit sIBM im Rahmen einer Untersuchung in 43 % der Fälle erhöhte Titer unspezifischer Autoantikörper nachgewiesen werden (KOFFMAN et al. 1998a). Analog zu anderen Autoimmunerkrankungen kommt es auch bei der sIBM zu einer familiären Häufung innerhalb derselben Generation (SIVAKUMAR et al. 1997). Auch die Assoziation von mehr als 22 % der sIBM-Patienten mit einer Paraproteinämie lässt zusätzlich auf eine Störung immunregulatorischer Vorgänge schließen (DALAKAS 2006). Verschiedene Expressionsmuster von Haplotypen des HLA-Systems und anderen immunregulatorischen Genen scheinen eine Rolle beim Krankheitsverlauf zu spielen (KOFFMAN et al. 1998b). Die Haplotypen HLA-DR3 und HLA-B8 finden sich signifikant häufiger bei sIBM-Patienten und erhöhen die Suszeptibilität gegenüber der Erkrankung (NEEDHAM und MASTAGLIA 2008). Ferner führt das Vorhandensein des Allels HLA-DRB1*03/*01 zu einem früheren Krankheitsbeginn sowie einem schwerwiegenderen Krankheitsverlauf (MASTAGLIA et al. 2009).

Der Nachweis zytotoxischer CD8⁺-T-Zellen stellt eines der Hauptmerkmale der entzündlichen Komponente im Rahmen der sIBM dar. Charakteristischerweise invadieren und umstellen diese endomysialen lymphozytären Infiltrate nahezu exklusiv MHC-Klasse-I-exprimierende, nicht-nekrotische Muskelfasern unter Bildung eines MHC-Klasse-I/CD8-Komplexes (GRIGGS et al. 1995, WIENDL et al. 2005). Um eine effiziente Extravasation im Rahmen einer Immunantwort zu gewährleisten, müssen T-Zellen spezifische Oberflächenmoleküle exprimieren, welche es ihnen über Bindung an entsprechende Moleküle auf Zielzellen erlauben, sich zu verankern, um eine Immunantwort zu exekutieren. Klassische Ankerproteine, die hierbei auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert werden, sind VLA-4 (engl. *very late antigen-4*) und LFA-1 (engl. *lymphocyte function-associated antigen-1*). Korrespondierende Adhäsionsmoleküle auf Zielzellen, mit welchen VLA-4 und LFA-1 in Wechselwirkung treten, stellen beispielsweise VCAM-I (engl. *vascular adhesion molecule-I*) und ICAM-I (engl. *intercellular adhesion molecule-I*) dar. Beide genannten Adhäsionsmoleküle befinden sich auf der Oberfläche von Muskelfasern der sIBM und werden unter proinflammatorischen Bedingungen, vor allem in Anwesenheit der Zytokine Interleukin-1beta (Abk. IL-1 β) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (Abk. TNF- α) induziert (DALAKAS 1995). Ferner konnte gezeigt werden, dass die involvierten CD8⁺-T-Zellen distinkte Aktivierungsmarker auf ihrer Zelloberfläche tragen. Zu diesen Oberflächenmarkern gehört beispielsweise das Molekül ICOS (engl. *inducible CO-stimulator*), welches als kostimulatorischer Faktor an T-Zell-Proliferation, Zytokinsekretion sowie Hochregulation proinflammatorischer Moleküle beteiligt ist und somit eine verstärkte T-Zell-Antwort auf ein Antigen unterhält (HUTLOFF et al. 1999, SCHMIDT et al. 2004). Obwohl das entsprechende (Auto-)Antigen bislang noch nicht identifiziert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass im Rahmen der sIBM eine spezifische, durch aktivierte zytotoxische T-Zellen vermittelte (Auto-)Immunantwort gegen Muskelfasern abläuft. Diese Hypothese wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass es sich bei den beteiligten T-Zellen um klonal expandierende Subpopulationen handelt, welche in verschiedenen Muskeln desselben Individuums über Jahre hinweg nachgewiesen werden konnten (MUNTZING et al. 2003). Um eine wirkungsvolle T-Zell-vermittelte Immunantwort zu erreichen, bedarf es der Expression kostimulatorischer Moleküle durch antigenpräsentierende Zellen. Analog zur ICOS-Expression auf T-Zellen zeigen Muskelfasern bei sIBM-Patienten eine erhöhte Expression des kostimulatorischen Moleküls ICOS-Ligand (Abk. ICOS-L). In immunhistochemischen Kollokalisationsstudien konnten Zell-zu-Zell-Kontakte zwischen ICOS-positiven T-Zellen und ICOS-L-/MHC-Klasse-I-doppelpositiven Muskelfasern nachgewiesen werden. Teile der ICOS-positiven autoaggressiven T-Zellen der sIBM beinhalten Perforin- und Granzym-Granula, deren Freisetzung in unmittelbarer Nähe der Muskelfasern zu deren Nekrose führt (SCHMIDT et al. 2004). Die genauen Ursachen, welche den Muskelgewebeschäden im

Rahmen der sIBM zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Perforin-vermittelte Myonekrose durch autoaggressive T-Zellen stellt höchstwahrscheinlich nur einen Mechanismus dar. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass zytotoxische T-Zellen in der sIBM auch das zytolytische Molekül Granulysin exprimieren (IKEZOE et al. 2006).

Der bereits beschriebene MHC-Klasse-I/CD8-Komplex sowie die Interaktion zwischen ICOS/ICOS-L als Voraussetzung für eine suffiziente Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle legen die Bildung einer immunologischen Synapse nahe und untermauern die Hypothese einer immunpathologischen Komponente der sIBM.

Die ubiquitäre Überexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen stellt ein weiteres Hauptmerkmal der entzündlichen Vorgänge im Muskel der sIBM dar. Im Unterschied zu den Muskeldystrophien mit einer Begleitentzündung und nicht-immunvermittelten nekrotisierenden Myopathien ist die Überexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen nicht an die Anwesenheit lymphozytärer Infiltrate gekoppelt, sondern findet sich auch in morphologisch weitgehend unauffälligen Muskelfasern. Obwohl dieses Phänomen auch im Rahmen der Polymyositis zu beobachten ist, stellt es vor allem unter Berücksichtigung der degenerativen Vorgänge im erkrankten Muskel ein wichtiges diagnostisches Kriterium der sIBM dar (VAN DER PAS et al. 2004). Die ubiquitäre Überexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen in der sIBM sowie die zusätzliche Expression der bereits erwähnten kostimulatorischen Oberflächenmarker unter proinflammatorischen Bedingungen weisen die beteiligten Muskelzellen als fakultativ antigenpräsentierende Zellen aus (FIGARELLA-BRANGER et al. 1990, GOEBELS et al. 1992). Gesunde Muskelfasern exprimieren normalerweise keine MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Es ist wahrscheinlich, dass die Hochregulation der ICOS-L- und MHC-Klasse-I-Moleküle durch die Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine induziert wird. Die größte Bedeutung kommt hierbei den Zytokinen Interferon-gamma (Abk. $\text{IFN-}\gamma$) und $\text{TNF-}\alpha$ zu (MICHAELIS et al. 1993, WIENDL et al. 2005). So konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Zyto- und Chemokine bei der sIBM im Muskel überexprimiert werden und möglicherweise bei der Kostimulation, T-Zell-Aktivierung sowie Transmigration eine entscheidende Rolle spielen und die Invasion autoaggressiver T-Zellen im Muskel der sIBM von einem lokalen proinflammatorischen Milieu unterhalten wird (DE BLEECKER et al. 2002, FIGARELLA-BRANGER et al. 2003, RAJU et al. 2003). Zu den hochregulierten Zytokinen zählen $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ und *Transforming growth factor-beta* (Abk. $\text{TGF-}\beta$) (LUNDBERG et al. 1997, SCHMIDT et al. 2008) sowie die der Familie der Chemokine angehörigen Zytokine CXC-Ligand (CXC-L)-9, CXC-L-10 (RAJU et al. 2003), CCL-3 und CCL-4 (CIVATTE et al. 2005). Ein chronisch entzündliches Milieu führt möglicherweise unmittelbar zu einer Schädigung von Muskelfasern, wie es im Falle der Anwesenheit von $\text{IL-1}\beta$ (BROUSSARD et al. 2004) und $\text{TNF-}\alpha$ (LI et al. 2005) bereits gezeigt werden konnte. Interessanterweise werden diese Zytokine nicht nur von primär

immunologisch kompetenten Zellen, sondern auch von Endothelzellen und Muskelfasern selbst exprimiert (SCHMIDT et al. 2008). Muskelfasern unterhalten somit das proinflammatorische Mikromilieu und tragen als aktive Modulatoren zur Persistenz und Chronizität der immunpathologischen Prozesse bei (WIENDL et al. 2005).

Eine weitere Hypothese bezüglich der beobachteten Überexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen in der sIBM schlägt eine Beteiligung einer Stressreaktion des endoplasmatischen Retikulums (Abk. ER) vor, die unter anderem eine Hochregulation von Zellstressmarkern wie α B-Crystallin nach sich zieht (BANWELL und ENGEL 2000, NAGARAJU et al. 2005). Möglicherweise kommt es im Rahmen der Überladung der Muskelfasern mit MHC-Klasse-I-Molekülen zu einer mangelhaften Konformationsänderung und Fehlfaltung von Antigen-Material mit konsekutiver Zellstress-Antwort (DALAKAS 2006). Interessanterweise konnte in transgenen Mäusen bereits gezeigt werden, dass die alleinige Überexpression von MHC-Klasse I bereits ausreicht, eine suffiziente ER-Stress-Reaktion zu induzieren (NAGARAJU 2005). Ob sich die MHC-Klasse-I-Hochregulation auf Muskelfasern unter Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen als Folge von ER-Stress oder einem Zusammenspiel beider Prozesse vollzieht, ist noch nicht abschließend geklärt. Sie scheint jedoch eine zentrale Rolle im Krankheitsprozess zwischen Antigenpräsentation, Proteinakkumulation und verzögerter Muskelfaserregeneration einzunehmen (NEEDHAM und MASTAGLIA 2008).

Obwohl $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen eine zentrale Bedeutung in der Immunpathogenese der sIBM zukommt, scheinen auch andere Zellen des Immunsystems an den zugrundeliegenden Pathomechanismen beteiligt zu sein. So konnten sowohl B-Zellen als auch klonal expandierende $CD138^+$ -Plasmazellen im Muskel der sIBM nachgewiesen werden, deren Anwesenheit eine antigenvermittelte humorale Immunantwort nahelegt (BRADSHAW et al. 2007, GREENBERG et al. 2005). Verschiedene entzündliche Myopathien zeigen charakteristische Gen-Expressionsmuster, welche eine Klassifikation auf molekularer Ebene ermöglichen. Für die sIBM konnte gezeigt werden, dass unter anderem Immunglobulin (Abk. Ig)-Transkripte signifikant erhöht sind (GREENBERG et al. 2002). Neben einer gesteigerten Inzidenz von monoklonalen Gammopathien unter sIBM-Patienten, welche eine chronische B-Zell-Aktivierung mit konsekutiver Ig-Produktion impliziert, konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass Serum-IgG von sIBM-Patienten an myonukleäre Antigene bindet (DALAKAS et al. 1997). Die Bedeutung, welche diesen Beobachtungen beizumessen ist, kann derzeit nicht befriedigend beantwortet werden. Da einige dieser Phänomene nicht ausschließlich bei der sIBM vorkommen, sondern auch anderen Myositiden sowie weiteren autoimmun-vermittelten Erkrankungen zu eigen sind, handelt es sich hierbei möglicherweise lediglich um einen Hinweis auf Vorgänge allgemeiner immunologischer Dysregulation.

DCs gehören hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Antigene zu präsentieren, zu den potentesten Immunzellen und spielen an der Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr im Rahmen zahlreicher immunvermittelter Erkrankungen eine zentrale Rolle (ROSSI und YOUNG 2005). Kürzlich konnten neben B-Zellen zusätzlich BDCA (engl. *blood dendritic cell antigen*)-1⁺ myeloide DCs in Muskelfasern der sIBM identifiziert werden. Ähnlich wie bei den beteiligten T-Zellen beobachtet finden sich diese Zellen vor allem in der Umgebung nicht-nekrotischer Muskelfasern. Zu den möglichen Aufgaben der DCs in der sIBM zählen Phagozytose, Endozytose und rezeptorvermittelte Antigenaufnahme im Bereich der umstellten Muskelfasern (GREENBERG et al. 2007). Normalerweise kehren myeloide DCs in lokale Lymphknoten zurück, um die aufgenommenen Antigene dort gegenüber T- und B-Zellen zu präsentieren (BANCHEREAU und STEINMAN 1998). Möglicherweise aber präsentieren die myeloiden DCs im Muskel der sIBM-Antigene lokal innerhalb des Muskelgewebes an T- sowie B-Zellen und tragen somit zu deren Aktivierung bei. Die Tatsache, dass die im Muskel identifizierten DCs häufig in räumlicher Nähe zu T-Zell-Infiltraten zu finden sind, sowie ihre sternförmig-differenzierte Morphologie unterstützen diese Vermutung. Interessanterweise datieren wichtige immunhistochemische Arbeiten zur Rolle verschiedener Immunzellen im Muskel (ARAHATA und ENGEL 1986, ENGEL und ARAHATA 1984) vor der Erkenntnis, dass DCs an autoimmunvermittelten Prozessen regelmäßig beteiligt sind, was möglicherweise dazu beigetragen hat, die Rolle der DCs an der Pathogenese der sIBM bisher zu unterschätzen (GREENBERG et al. 2007). Untersuchungen zu anderen entzündlichen und autoimmunvermittelten Erkrankungen konnten regelmäßig zeigen, dass an den resultierenden Gewebeschäden meist eine Kombination zahlreicher Effektormechanismen beteiligt ist. Es ist daher denkbar, dass DCs neben T-Zellen entweder direkt oder über Initialisierung noch nicht identifizierter Mechanismen am Muskelgewebeschaden der sIBM beteiligt sind und dazu beitragen, entzündliche Läsionen aufrechtzuerhalten (HOHLFELD und DORNMAIR 2007).

Möglicherweise ist die entzündliche Komponente der sIBM den degenerativen Vorgängen in den Muskelfasern vorgeschaltet. So ließen sich unter anderem Korrelationen der Expression von APP als einem wichtigen Marker für degenerative Prozesse und proinflammatorischer Mediatoren wie IFN- γ und CXCL-9 auf mRNA-Ebene nachweisen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Exposition von Muskelzellen gegenüber IL-1 β und IFN- γ zu einer Überexpression von APP mit konsekutiver Akkumulation von β -Amyloid führte (SCHMIDT et al. 2008).

1.1.8.2 Degenerative Pathomechanismen der sIBM

Die degenerativen Veränderungen im Muskel der sIBM sind charakterisiert durch das Auftreten von Einschlusskörpern und lysosomalen Vakuolen, sogenannten *rimmed vacuoles*. Die lysosomalen Vakuolen finden sich vornehmlich in Muskelfasern, welche keine lymphozytären Infiltrate aufweisen (DALAKAS 2006).

Bei den Einschlusskörpern handelt es sich um intrazelluläre Ansammlungen von Kongorot-positivem Amyloid sowie Amyloid-assoziierten Molekülen wie APP, phosphoryliertem Tau, Ubiquitin, Presenilin-1, α -Synuclein und weiteren aberranten Proteinen (ASKANAS und ENGEL 2003). Hierbei lassen sich zwei Hauptgruppen von Proteinaggregaten unterscheiden, die entweder vornehmlich β -Amyloid oder phosphoryliertes Tau enthalten (ASKANAS und ENGEL 1993). Die zytoplasmatischen Einschlusskörper finden sich vor allem in vakuolenfreien Muskelfasern (VATTEMI et al. 2004).

Wenngleich das Vorliegen der beschriebenen Proteinakkumulationen keinesfalls spezifisch für die sIBM ist und auch bei anderen vakuolären Myopathien beobachtet werden kann (FERRER et al. 2005, SELCEN et al. 2004), ist das simultane Auftreten einer immunpathologischen Komponente mit lymphozytären Infiltraten und Hochregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen neben degenerativen Veränderungen charakteristisch für die sIBM (DALAKAS 2006). Die Frage, ob die inflammatorischen Mechanismen den degenerativen kausal vorausgehen oder aber eine primär myodegenerative Pathogenese mit konsekutiver Immunantwort vorliegt, konnte bisher nicht befriedigend beantwortet werden.

Durch verschiedene Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass Muskelfasern der sIBM eine Überexpression von Genen aufweisen, welchen eine Rolle in immun-medierten und degenerativen Erkrankungen zukommt. Allerdings finden sich auch bei anderen inflammatorischen Myopathien wie der Polymyositis oder der Dermatomyositis Erhöhungen der mRNA-Expression von relevanten Genen, die beispielsweise für β -Amyloid oder Tau kodieren (GREENBERG et al. 2002, RAJU und DALAKAS 2005). Dies legt nahe, dass die bei der sIBM beobachteten Proteinakkumulationen weniger das Resultat unkontrollierter Genaktivierung und transkriptioneller Fehlregulationen sind, sondern vielmehr posttranslationale Vorgänge an ihrer Entstehung entscheidend mitwirken. Hierbei stellen das Anfallen fehlgefalteter Proteine in der Folge von ER-Stress sowie mangelhafte proteasomale Degradation mögliche Mechanismen dar (NEEDHAM und MASTAGLIA 2008). Die proteasomale Untereinheit 26S ist im sIBM-Muskel erhöht, was möglicherweise als kompensatorische Antwort des Ubiquitin-Proteasomen-Systems (Abk. UPS) auf die vermehrte Anhäufung fehlgefalteter Proteine zu werten ist (FRATTA et al. 2005). Ferner findet sich im sIBM-Muskel eine Erhöhung diverser ER-Chaperone, welche normalerweise für eine korrekte Faltung anfallender Proteine sorgen und verhindern sollen, dass es zur

Akkumulation ungefalteter Proteine in der Zelle kommt. Dieselben Chaperone kolokalisieren zudem mit β -Amyloid in den Muskelzellen, was auf eine mögliche Beteiligung der Chaperone bei der Faltung und Entfernung dieses Polypeptids schließen lässt (VATTEMI et al. 2004).

Im Vergleich mit anderen inflammatorischen Myopathien ist lediglich bei der sIBM eine positive Korrelation zwischen der mRNA-Expression von APP und der mRNA-Expression verschiedener Zyto- und Chemokine zu beobachten. Die Exposition von Muskelzellen zu IL-1 β induziert die Überexpression von APP mit konsekutiver Akkumulation von β -Amyloid, vor allem in Kombination mit IFN- γ (SCHMIDT et al. 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Vorliegen von α B-Crystallin mit der Überexpression von APP im sIBM-Muskel assoziiert ist. Die Hochregulation dieses Hitzeschockproteins, welches normalerweise als Zellstressantwort ein Entzündungsgeschehen negativ reguliert, geht hierbei einer Akkumulation von β -Amyloid voraus, was die Hypothese einer möglichen Interaktion zwischen Inflammation, Zellstress und degenerativen Prozessen im Muskel der sIBM weiter untermauert (MUTH et al. 2009, OUSMAN et al. 2007). Auch die Tatsache, dass β -Amyloid selbst über eine Erhöhung der Stickstoff (NO)-Expression zu Zellstress in Neuronen führt (YANG et al. 1998), legt die Vermutung nahe, dass bei der sIBM komplex miteinander interagierende, sich selbst erhaltende und verstärkende Mechanismen zum Tragen kommen.

β -Amyloid und seinem Vorläuferprotein APP kommen möglicherweise zentrale Rollen in der Pathogenese der sIBM zu (ASKANAS und ENGEL 2001). Hierbei scheinen die degenerativen Prozesse von einer erhöhten APP-Synthese und einer abnormen Prozessierung dieses Proteins ihren Ausgang zu nehmen (ASKANAS und ENGEL 2006). Das Auftreten von Amyloid-positiven Ablagerungen kann der Vakuolenbildung in Muskelfasern vorausgehen (ASKANAS et al. 1992). Neben der Induktion von oxidativem Stress durch β -Amyloid-vermittelte Überexpression von Stickstoffmonoxid (NO) kommen sowohl der Akkumulation von β -Amyloid als auch von APP selbst zytotoxische Eigenschaften zu. Beide tragen möglicherweise zum Untergang von Muskelzellen bei (QUERFURTH et al. 2001, SUGARMAN et al. 2006, YANG et al. 1998). Durch die alleinige Überexpression von APP in Muskelzellkulturen und transgenen Mäusen konnten sIBM-ähnliche Phänomene wie beispielsweise die Akkumulation von Amyloid, das Auftreten von Einschlusskörpern und strukturelle Veränderungen von Mitochondrien induziert werden (ASKANAS et al. 1996, ASKANAS et al. 1997, JIN et al. 1998). In Kultur gehaltene Muskelfasern aus Biopsien von sIBM-Patienten zeigen keine erhöhte Expression von APP (McFERRIN et al. 1999), was die Schlussfolgerung zulässt, dass es sich bei den im Rahmen der sIBM beobachteten degenerativen Veränderungen möglicherweise um sekundäre Vorgänge handelt. Die bereits beschriebene IL-1 β - und IFN- γ -induzierte Überexpression von APP sowie die Zellstress-

assoziierten Degenerationsvorgänge mit konsekutiver Akkumulation von β -Amyloid in Muskelzellen (MUTH et al. 2009, SCHMIDT et al. 2008) unterstützen diese Vermutung.

Das Peptid β -Amyloid entsteht durch sequenzielle Spaltung des glykosylierten Transmembranproteins APP mittels der β - und γ -Sekretasen im amyloiden Stoffwechselweg (SELKOE 2001, VASSAR 2004). Mit Hilfe der α -Sekretase kann eine nicht-amyloide Prozessierung von APP erfolgen. Hierbei spaltet die α -Sekretase APP zwischen den Lysinresten 16 und 17 der β -Amyloid-Domäne, wodurch die Bildung von β -Amyloid verhindert wird (DE STROOPER und ANNAERT 2000). APP setzt sich aus einem längeren N-terminalen extrazellulären Anteil sowie einer kürzeren zyttoplasmatischen Domäne zusammen. Im Rahmen des amyloiden Stoffwechselwegs spaltet zunächst die membranständige β -Sekretase BACE1 (engl. *β -site APP cleaving enzyme 1*) APP in die sezernierte APP-Ektodomäne APP β und das membrangebundene C-terminale Fragment C99. Die Spaltung durch BACE1 ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der β -Amyloid-Produktion und liefert das N-terminale Ende des Peptids (HUSSAIN et al. 2000). C99 dient in der Folge als Substrat für die ebenfalls membranständige γ -Sekretase, durch deren Spaltungsaktivität das C-terminale Ende des β -Amyloids sowie eine intrazelluläre APP-Domäne (engl. *APP intracellular domain*, Abk. AICD) entstehen. Nach erfolgter Spaltung von C99 durch den Proteinkomplex der γ -Sekretase liegt β -Amyloid entweder in der 42 Aminosäuren langen Version β -Amyloid $_{1-42}$ oder der entsprechend zwei Aminosäuren kürzeren Version β -Amyloid $_{1-40}$ vor (COLE und VASSAR 2007, WOLFE et al. 1999). Unter physiologischen Bedingungen liegen β -Amyloid $_{1-40}$ und β -Amyloid $_{1-42}$ etwa in einem Verhältnis von 9 : 1 vor (MURPHY und GOLDE 2006). β -Amyloid $_{1-42}$ neigt eher zu Bildung von Oligomeren, ist aufgrund seiner ausgeprägten lipophilen Eigenschaften zytotoxischer und stellt die häufigere Variante im sIBM-Muskel dar (DAHLGREN et al. 2002, VATTEMI et al. 2003b, WALSH et al. 2002). Interessanterweise zeigen auch die MCK-APP/PS1 doppelt transgenen Mäuse, welche hauptsächlich das β -Amyloid $_{1-42}$ -Epitop überexprimieren, einen der sIBM sehr ähnlichen und besonders schwerwiegenden Verlauf mit frühem Verlust der Muskelkraft (KITAZAWA et al. 2006). BACE1 findet sich in erhöhter Form in Muskelfasern der sIBM. Hierbei akkumuliert das Enzym in Einschlusskörpern. Auch Untereinheiten des Multiproteinkomplexes der γ -Sekretase sind in Muskelfasern der sIBM überexprimiert. Sowohl BACE1 als auch die entsprechenden Untereinheiten der γ -Sekretase kolokalisieren hierbei mit β -Amyloid, was eine erhöhte amyloide Prozessierung von APP als Ausgangspunkt der Degeneration nahelegt (VATTEMI et al. 2001, VATTEMI et al. 2003a). In Astrozyten konnte bereits gezeigt werden, dass ein inflammatorisches Milieu über Hochregulation von BACE1 zu einer verstärkten Prozessierung von APP führt (HONG et al. 2003).

Die degenerativen Veränderungen mit Akkumulation von β -Amyloid, phosphoryliertem Tau, Presenilin-1 und weiteren aberranten Proteinen im Muskel der sIBM sind denen beim Morbus Alzheimer sehr ähnlich (ASKANAS und ENGEL 2001). Bei beiden Erkrankungen kann von einem Zusammenhang mit zellulären Alterungsprozessen ausgegangen werden. Im Muskel der sIBM scheinen Überexpression von APP und die konsekutive Akkumulation von β -Amyloid an der Entstehung strukturell und funktionell abnormer neuromuskulärer Synapsen beteiligt zu sein (McFERRIN et al. 1998). Analog hierzu liegen Hinweise vor, nach denen β -Amyloid-Ablagerungen auch für die Störung der synaptischen Übertragung zwischen Neuronen im Rahmen des Morbus Alzheimers verantwortlich zu sein scheinen (CUELLO 2005). Aufgrund dieser ähnlichen Veränderungen bei beiden Erkrankungen darf die Vermutung geäußert werden, dass beiden Krankheiten möglicherweise verwandte Pathomechanismen zugrunde liegen und die Aufklärung der Ätiologie der einen unter Umständen auch zu einem erweiterten Verständnis der anderen Krankheit beitragen könnte (ASKANAS und ENGEL 2006). Wenngleich Proteinaggregation, abnorme Faltung von Proteinen und Inhibition des Proteasoms bei beiden Erkrankungen zur Pathogenese beitragen, so sind doch beide Erkrankungen organspezifisch (ASKANAS und ENGEL 2003, LAM et al. 2000). Bisher konnte keine Korrelation zwischen der sIBM und einer demenziellen Entwicklung ähnlich der bei Morbus Alzheimer nachgewiesen werden. Alzheimer-Patienten zeigen nicht häufiger das charakteristische klinische Bild einer sIBM im Verlauf. Ungeachtet ihrer zahlreichen Gemeinsamkeiten unterscheiden sich die sIBM und der Morbus Alzheimer allerdings hinsichtlich der Lokalisierung der β -Amyloid-Ablagerungen. Diese finden sich vor allem in Form extrazellulärer kongophiler Plaques im Gehirn der Alzheimer-Patienten (FORLONI et al. 2002). Im Muskel der sIBM-Patienten hingegen lagern sich die β -Amyloid-Aggregate intrazellulär ab (ASKANAS und ENGEL 2001). Obwohl Muskelfasern, in denen APP überexprimiert wird, große Mengen an β -Amyloid extrazellulär sezernieren, findet sich in Muskelbiopsien von sIBM-Patienten kein Nachweis für β -Amyloid-haltige, extrazelluläre Plauebildung (ASKANAS und ENGEL 2006). Möglicherweise kommt auch den wenigen intrazellulären Amyloid-Ablagerungen beim Morbus Alzheimer eine bedeutendere pathologische Rolle bezüglich ihrer Neurotoxizität zu, als bisher angenommen wurde (ECHEVERRIA und CUELLO 2002, GOURAS et al. 2000).

In der Vergangenheit wurde bereits eine mögliche Beteiligung von Makroautophagie am Pathomechanismus des Morbus Alzheimer proklamiert (NIXON et al. 2005). In Neuronen des Morbus Alzheimer ist Makroautophagie hochreguliert und zeigt sich an der Generierung von β -Amyloid maßgeblich beteiligt (YU WH et al. 2005). Dass Makroautophagie auch im Rahmen der Pathogenese der sIBM eine mögliche Rolle zukommt, konnte erst kürzlich gezeigt werden (KUMAMOTO et al. 2004, LÜNEMANN et al. 2007a).

1.2 Autophagie

Im Rahmen der Homöostase von Biosynthese und Abbauprozessen stellt Autophagie neben dem UPS den wichtigsten physiologischen Stoffwechselweg zur Degradation von Makromolekülen und Organellen innerhalb der Zelle dar (UCHIYAMA et al. 2008).

Während das UPS lediglich entfaltete Proteine prozessieren kann, welche zuvor mit Ubiquitin markiert wurden, werden durch Autophagie auch gefaltete Proteine und komplette Organellen verarbeitet (RUBINSZTEIN et al. 2007). Hierbei versteht man unter Retikulophagie, Pexophagie und Mitophagie Subspezialitäten autophagischer Aktivität, welche dem spezifischen Abbau der jeweiligen Organellen dienen (HUANG und KLIONSKY 2007, YU L et al. 2008).

Autophagie stellt einen unter Eukaryoten hoch konservierten Degradationsmechanismus dar und lässt sich in mindestens drei Subgruppen unterteilen. Man unterscheidet zwischen Chaperon-vermittelter Autophagie (engl. *chaperone-mediated autophagy*, Abk. CMA), Mikroautophagie und Makroautophagie (KLIONSKY 2007, MASSEY et al. 2006). Alle drei Prozesse haben den Import zytosolischen Materials in Lysosomen gemeinsam und unterscheiden sich lediglich in ihrer physiologischen Funktion und der Art des Transports zu den Lysosomen.

Bei der CMA erfolgt mit Hilfe spezifischer Chaperone, welche der Entfaltung der Strukturen dienen, eine direkte Umverteilung zytosolischen Materials über die lysosomale Membran. Die zur Degradation bestimmten Proteine sind hierbei mit einem bestimmten Pentapeptid-Motiv markiert (UCHIYAMA et al. 2008). Im Rahmen der Mikroautophagie erfolgt die Sequestrierung zytosolischen Materials direkt durch Septierung und Invagination in das Lysosom (RUBINSZTEIN et al. 2007). Im Folgenden soll ausschließlich auf den Prozess der Makroautophagie näher eingegangen werden.

Makroautophagie nimmt ihren Ausgang von einer sogenannten Isolationsmembran oder Phagophore, welche zur Degradation bestimmte Makromoleküle umschließt und so das Autophagosom bildet (REGGIORI und KLIONSKY 2005). Der genaue Ursprung dieser Isolationsmembranen ist bisher nur rudimentär erforscht. Möglicherweise liegt eine Kombination aus *de-novo*-Synthese und Bereitstellung von Membranen durch das ER vor. Auch scheint den Mitochondrien eine wesentliche Rolle bei der Anordnung dieser initialen Strukturen zuzukommen (TOOZE und YOSHIMORI 2010). Der Prozess bis zur Bildung des Autophagolysosoms lässt sich in drei Phasen gliedern. Zunächst kommt es im Rahmen der Initiationsphase meist durch Aktivierung der Zielstruktur von Rapamycin in Säugetierzellen (engl. *mammalian target of rapamycin*, Abk. mTOR) zur Bildung eines Initiationskomplexes (engl. *autophagy initiation complex*, Abk. AIC). Die Bildung der Isolationsmembran mit konsekutiver Expansion und Manifestation als Autophagosom wird unter dem Begriff der Exekutionsphase zusammengefasst. Die gebildeten Autophagosomen fusionieren in der

Maturationsphase mit Lysosomen und werden fortan als Autophagolysosomen bezeichnet. Durch Zusammenschluss dieser beiden vesikulären Strukturen kommt der abzubauen Inhalt der Autophagosomen mit den hydrolysierenden Enzymen der Lysosomen in Kontakt und kann im sauren Milieu dieses neu entstandenen Zellkompartiments daraufhin abgebaut werden (HUANG und KLIONSKY 2007, SUZUKI und OHSUMI 2007, UCHIYAMA et al. 2008). Makroautophagie ist streng zu trennen von dem Endozytose-vermittelten lysosomalen Abbau extrazellulärer und Plasmamembran-Proteine.

Weiterhin lässt sich Makroautophagie in induzierte und basale Makroautophagie unterteilen. Wobei erstere in der Bereitstellung von Aminosäuren bei Nährstoffmangel der Zelle resultiert und letztere vornehmlich dem konstitutiven Umsatz zytoplasmatischer Komponenten dient und in zahlreichen Zelltypen bereits identifiziert werden konnte (MIZUSHIMA 2007). Entsprechend kann es bei insuffizienter Makroautophagie zu einer Akkumulation zytoplasmatischer Bestandteile und konsekutivem Untergang der Zelle kommen (HARA et al. 2006, KOMATSU et al. 2005). Allerdings kann auch Überaktivität autophagischer Prozesse dem Krankheitsgeschehen verschiedener Pathologien zuträglich sein (KOIKE et al. 2005, RABEN et al. 2007).

1.2.1 Molekulare Maschinerie der Makroautophagie

Für autophagische Prozesse essenzielle Gene (engl. *autophagy-related genes*, Abk. ATGs) wurden erstmalig in Hefen identifiziert (MATSUURA et al. 1997). Mittlerweile sind mindestens 31 dieser Gene bekannt und ihre entsprechenden Homologe in Säugetieren identifiziert (KABEYA et al. 2007, UCHIYAMA et al. 2008). Die Produkte der überwiegenden Anzahl dieser Gene scheinen für die Bildung der initialen Isolationsmembran verantwortlich zu sein (KIM et al. 2001, SUZUKI und OHSUMI 2007). ATG8 bzw. sein Säugetier-Homolog *microtubule-associated protein 1 light chain 3* (Abk. LC3) sowie ATG12 sind Ubiquitin-ähnliche Proteine, welche beide von ATG7 aktiviert werden. ATG7 ist ein Homolog des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (Abk. E1). Die genauen Funktionen von LC3 und ATG12 sind nicht vollständig aufgeklärt, jedoch sind beide Proteine essenziell für die Bildung von Autophagosomen (HANADA und OHSUMI 2005). Im Rahmen der Autophagosomen-Bildung wird LC3 mit seinem C-Terminus kovalent an das Phospholipid Phosphatidylethanolamin an der inneren sowie äußeren Membran der Autophagosomen gebunden und ist das einzige bisher bekannte ATG-Protein, welches in Säugetierzellen mit dem komplett gebildeten Autophagosom assoziiert bleibt. LC3 wird daher regelmäßig als Marker für makroautophagische Aktivität verwendet. Nach Fusion der Autophagosomen mit Lysosomen wird LC3 durch lysosomale Enzyme rasch abgebaut (KABEYA et al. 2000, MIZUSHIMA und KLIONSKY 2007, TANIDA et al. 2005).

1.2.2 Regulation von Makroautophagie

Die Regulation von Makroautophagie in Säugetieren ist hoch komplex. Der Mangel essenzieller Nährstoffe für die Zelle zählt zu den potentesten physiologischen Induktionsstimuli für Makroautophagie (TAKESHIGE et al. 1992). Die Depletion von Wachstumsfaktoren, Akkumulation aberranter Proteine sowie oxidativer Stress führen außerdem zu einer Hochregulation makroautophagischer Aktivität (HUANG und KLIONSKY 2007, LEVINE und KROEMER 2008). Der klassische Regulationsmechanismus verläuft über mTOR. Diese Serin/Threoninkinase ist an der Integration und Regulation unterschiedlicher Signalwege wie Translation, am Energiehaushalt der Zelle sowie an der Zellzyklus-Progression beteiligt (KAMADA et al. 2000). Während eine erhöhte mTOR-Aktivität zu einer Hemmung von Makroautophagie führt, kann durch Inhibition von mTOR, beispielsweise mittels des lipophilen Makrolids Rapamycin, eine Induktion von makroautophagischer Aktivität erreicht werden (KLIONSKY et al. 2005, RUBINSZTEIN et al. 2007). Zusätzlich kann Makroautophagie über einen mTOR-unabhängigen Stoffwechselweg mittels Erniedrigung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (Abk. IP₃) hochreguliert werden. Über diesen Mechanismus führt beispielsweise Lithium zu einer Induktion von Makroautophagie (SARKAR et al. 2005). In Säugetieren wird die Bildung der Isolationsmembran durch einen autophagiespezifischen Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Kinase (Abk. PI3K)-Komplex vermittelt (KIHARA et al. 2001). Somit wird eine pharmakologische Inhibition makroautophagischer Aktivität unter anderem über die PI3K-Inhibitoren 3-Methyladenin (Abk. 3-MA), Wortmannin und LY294002 erreicht (BLOMMAART et al. 1997, RUBINSZTEIN et al. 2007, SEGLEN und GORDON 1982). Auf hormoneller Ebene sind vor allem Insulin als Inhibitor und Glukagon als Induktor an der Regulation von Makroautophagie beteiligt (MIZUSHIMA und KLIONSKY 2007).

1.2.3 Makroautophagie und Krankheit

In der Vergangenheit konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass verschiedenen autophagischen Prozessen bei der Pathoätiologie neurodegenerativer Erkrankungen eine wichtige Rolle zukommt (HARA et al. 2006, KOMATSU et al. 2006). Sowohl Makroautophagie als auch CMA scheinen am Pathomechanismus des idiopathischen Parkinson-Syndroms beteiligt zu sein (CUERVO et al. 2004, WINSLOW et al. 2010). Neben der Huntington-Krankheit (KEGEL et al. 2000, RAVIKUMAR et al. 2004) und der Amyotrophen Lateralsklerose (Abk. ALS) (PASQUALI et al. 2010) konnte vor allem bei der Alzheimer-Krankheit eine gestörte autophagische Aktivität als Teil des zugrundeliegenden Pathomechanismus identifiziert werden (NIXON et al. 2005, YU WH et al. 2005). Die Rolle der Autophagie bei diesen Erkrankungen ist hierbei jedoch nicht einheitlich. Während die Stimulation von Autophagie durch Rapamycin in Zell- und Fliegen-Modellen der Huntington-

Erkrankung zu einer Reduktion der Huntingtin-Aggregate führt (RAVIKUMAR et al. 2004), scheint beispielsweise bei der Alzheimer-Erkrankung eine ineffiziente Maturation und Fusion der Autophagosomen mit Lysosomen die Akkumulation aberranter Proteine zu unterhalten (NIXON 2006). Die Tatsache, dass Autophagie in unterschiedlicher Weise an den Prozessen verschiedener Erkrankungen beteiligt ist, unterstreicht die Komplexität dieses Zellmechanismus.

Eine weitere bedeutende Rolle kommt der Autophagie im Rahmen des Zelltodes zu. Neben der Apoptose, welche auch als programmierter Zelltod (engl. *programmed cell death*, Abk. PCD) vom Typ I bezeichnet wird, versteht man unter dem autophagischen Zelltod den Typ-II-PCD (CLARKE 1990). Beide Mechanismen ziehen charakteristische morphologische Veränderungen nach sich. Während es im Rahmen der Apoptose vor allem zu DNA-Fragmentation, Zusammenbruch des Zytoskeletts, Chromatin-Kondensation und Zellschrumpfung kommt (LOCKSHIN und ZAKERI 2004), manifestiert sich der Typ-II-PCD vor allem durch Proliferation von Autophagosomen und progrediente Elimination von Zellorganellen bei gleichzeitig erhaltener Integrität des Zytoskeletts sowie des Nukleus (HORNUNG et al. 1989, SCHWEICHEL und MERKER 1973). Die strikte akademische Trennung der verschiedenen Zelltodmechanismen wird den tatsächlichen biologischen Vorgängen möglicherweise nicht gerecht. So kommt es neben weiteren Überschneidungen der Zelltodmechanismen auch im Rahmen des Typ-II-PCD zu einer Rekrutierung der Apoptose-Maschinerie (LEE und BAEHRECKE 2001, MARTIN und BAEHRECKE 2004).

Darüber hinaus wurde Makroautophagie in der Vergangenheit mit alternativen Mechanismen der Antigenpräsentation in Verbindung gebracht. So wurde in professionellen Antigen-präsentierenden Zellen und IFN- γ -aktivierten epithelialen Zelllinien gezeigt, dass Beladungskompartimente der MHC-Klasse-II-Moleküle (Abk. MIICs) regelmäßig Antigenmaterial aus Autophagosomen erhalten (PALUDAN et al. 2005, SCHMID et al. 2007).

1.2.4 Die Rolle der Makroautophagie bei der sIBM

Eine mögliche Beteiligung makroautophagischer Prozesse am Pathomechanismus der sIBM wurde bereits vorgeschlagen (LÜNEMANN et al. 2007a). In humanen Muskelzellen kolokalisierte APP mit dem Autophagosomenmarker LC3. Diese Kolokalisation war mit einer Hochregulation von MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass es im Vergleich zu nicht-myopathischen Muskelproben im Muskel der sIBM-Patienten zu einem vermehrten Auftreten APP- und β -Amyloid-haltiger Autophagosomen kommt. Hierbei wurden die APP/ β -Amyloid- und LC3-doppelt-positiven Strukturen nahezu ausschließlich in bereits degenerativ veränderten Muskelfasern vom Typ II (schnell zuckend) identifiziert (LÜNEMANN et al. 2007b). Interessanterweise zeigen vor allem Muskelfasern vom Typ II unter Nährstoffmangel eine Hochregulation von Makroautophagie in GFP-LC3-transgenen

Mäusen (MIZUSHIMA et al. 2004). Ein Teil der untersuchten Muskelfasern zeigte sich doppelt-positiv für MHC-Klasse-II-Moleküle und β -Amyloid. In nahezu allen dieser doppelt-positiven Muskelfasern wurden ferner positive Signale für LC3 sowie $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Zellinfiltrate identifiziert. Dies gibt Grund zu der Annahme, dass die Hochregulation von Makroautophagie im sIBM-Muskel auch an einer MHC-Klasse-II-vermittelten Antigen-Präsentation gegenüber $CD4^+$ -T-Zellen beteiligt sein könnte (LÜNEMANN et al. 2007b). Da es sich bei Muskelfasern grundsätzlich um fakultativ Antigen-präsentierende Zellen handelt und die Muskelfasern bei der sIBM Charakteristika dieser Zellen zeigen, ist auch eine Beteiligung von Makroautophagie an den immun-medierten Prozessen der sIBM denkbar (LÜNEMANN et al. 2007a, SCHMIDT et al. 2004).

Inwieweit die Modulation von Makroautophagie im Rahmen der sIBM Einfluss auf die Akkumulation von β -Amyloid und APP nimmt, welche Rolle ihr möglicherweise als Vermittlerin zwischen inflammatorischen und degenerativen Pathomechanismen zukommt und ob ihre Hochregulation ein sekundäres Geschehen im Sinne einer protektiven Zellreaktion darstellt, konnte bisher nicht geklärt werden.

1.3 Ziel dieser Arbeit

Die genaue Pathoätiologie der sIBM sowie das komplexe Zusammenspiel der zugrundeliegenden Pathomechanismen sind bis heute nur unzureichend verstanden. Die sIBM ist charakterisiert durch das parallele Auftreten von inflammatorischen und degenerativen Prozessen im Skelettmuskel der Betroffenen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Interaktionen proinflammatorischer Zytokine, MHC-Expression, Makroautophagie und Akkumulation von APP bzw. β -Amyloid im humanen Skelettmuskel untersucht werden. Eine mögliche Rolle der Makroautophagie als Bindeglied zwischen Inflammation und Degeneration stand hierbei im Zentrum der Fragestellung. Im Einzelnen wurden folgende Fragen bearbeitet:

1. Kann Makroautophagie als konstitutiv aktiver Prozess in humanen Skelettmuskelzellen identifiziert werden?

Hierzu wurde unter Zuhilfenahme des Autophagosomenmarkers LC3 mittels Immunzytochemie untersucht, ob Makroautophagie in der mit einem lentiviralen GFP-LC3-Fusions-Konstrukt transfizierten humanen Rhabdomyosarkom-Zelllinie CCL136 sowie in primären humanen Muskelzellen auf einem basalen Niveau aktiv ist.

2. Lässt sich Makroautophagie pharmakologisch und mit Hilfe von RNA-Interferenz in humanen Muskelzellen modulieren?

Mittels Immunzytochemie und Western Blot sollte gezeigt werden, ob sich Makroautophagie in diesen Zellen über Inhibition von mTOR durch Rapamycin und RNA-Interferenz positiv bzw. negativ regulieren lässt.

3. Welche proinflammatorischen Moleküle führen in humanen Muskelzellen zu einer Modulation makroautophagischer Aktivität?

Aus einer Reihe von möglichen Kandidaten sollten mittels Immunzytochemie und Western Blot proinflammatorische Moleküle identifiziert werden, welche zu einer Modulation makroautophagischer Aktivität in humanen Muskelzellen führen.

4. Inwiefern ist Makroautophagie an der MHC-Klasse-I- und -II-Expression in humanen Muskelzellen beteiligt?

Mit Hilfe durchflusszytometrischer Analyse sollte eine mögliche Verbindung zwischen Zytokin-vermittelter Modulation von Makroautophagie und Hochregulation von MHC-Klasse-I- bzw. -II-Molekülen beleuchtet werden.

5. Besteht eine Verbindung zwischen Zytokin-vermittelter Modulation von Makroautophagie und der Akkumulation von APP und β -Amyloid in humanen Muskelzellen?

Durch Immunzytochemie und Western Blot-Analyse sollte eine mögliche Verbindung zwischen makroautophagischer Aktivität und der Akkumulation der Moleküle APP und β -Amyloid untersucht werden. Gleichzeitig sollte auch beobachtet werden, ob sich unter Modulation von Makroautophagie eine Veränderung der Akkumulation von β -Amyloid erzielen lässt.

Eine umfassendere Aufklärung der Interaktionen zwischen proinflammatorischen Zytokinen, makroautophagischer Aktivität sowie MHC-Klasse-II-Expression in Muskelzellen als Mechanismus autoimmun-entzündlicher Muskelerkrankungen könnte zu einem besseren Verständnis der komplexen Zusammenhänge der sIBM beitragen.

2. Material

2.1 Labormaterialien

Tabelle 2.1-1: Liste verwendeter Labormaterialien (in alphabetischer Reihenfolge)

Produkt	Hersteller
8-Kammer-Objektträger, <i>Chamberslide</i>	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
96-Vertiefungsplatten für Real Time-PCR, <i>ABgene® PCR Plates Thermo Fast® 96 Detection Plate</i>	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Bechergläser	Schott Duran, Mainz, Deutschland
Deckgläser, 24*60 mm	Menzel-Gläser®, Braunschweig, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Schott Duran, Mainz, Deutschland
FACS-Röhrchen, 5 ml, <i>Polystyrene round bottom tubes</i>	BD Biosciences, Bedford, USA
Falkonröhrchen, steril, 15 ml und 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Filme für Immunoblotting, <i>Hyperfilm™ ECL™</i>	Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutschland
Filterpapier, <i>Mini Trans-Blot</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
Flüssigkeits-Blocker-Stift (<i>PapPen</i>), Liquid-Blocker (<i>Super PapPen</i>)	SCI Science Services GmbH, München, Deutschland
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schwell, Dassel, Deutschland
Gewebekulturschalen, Ø 10 cm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Glaspipetten, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Schuetz-biotec GmbH, Göttingen, Deutschland
Klebefolien für Real Time-PCR-Platten, <i>MicroAmp™ Optical Adhesive Film</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
Kristallpipettenspitzen, Gilsonpipettenspitzen (gelb und blau)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Kryokonservierungsröhrchen, <i>Cryotube™ vials</i>	Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Kulturflaschen, 75 cm ²	In Vitro Systems & Service, Göttingen, Deutschland
Küvetten, Typ <i>UVette</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Laborhandschuhe, <i>Peha-soft</i>	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Labortücher, <i>Kimtech Science</i>	Kimberly-Clark Professional, Roswell, USA
Nitril-Handschuhe, <i>Nitra-Tex® EP</i>	Ansell GmbH, München, Deutschland
Nitrozellulosetransfermembran, Porengröße 0,45 µm	Whatman, Dassel, Deutschland
Parafilm	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Pasteurpipetten	Wilhelm Ulbrich GbR Laborglaswaren, Bamberg, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipetten, Typ <i>Research</i> (2,5/10/20/100/200/1000 µl Hubvolumen)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Reaktionsgefäß, 1,5/2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Schwämme für Proteintransfer	Bio-Rad, Hercules, USA
Sterilfilter, 0,22 µm, <i>GP Express Plus</i>	Millipore, Schwalbach, Deutschland
<i>Membran Sterilfilter</i>	
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Well-Platten, <i>Microwell</i> (96)	Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Well-Platten, <i>Multiwell</i> (24)	In vitro Systems & Service, Göttingen, Deutschland
Well-Platten, <i>Multiwell</i> (6)	Greiner GmbH, Nürtingen, Deutschland
<i>Whatman Protan Nitrozellulosemembran</i>	Schleicher und Schuell, Erdmannshausen, Deutschland
Zählkammer, <i>Neubauer Improved</i> , 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm ² Fläche	Krannich GmbH, Göttingen, Deutschland
Zellschaber, steril	Costar Corning, Badhoevendorp, Niederlande

2.2 Geräte

Tabelle 2.2-1: Liste verwendeter Geräte (in alphabetischer Reihenfolge)

Produkt	Hersteller
Brutschrank, <i>Hera cell 240</i> und <i>Hera cell 150</i>	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Brutschrank, <i>Incubator IS-2</i>	Incutec, Mössingen, Deutschland
Durchflusszytometer, Typ <i>BD LSR II</i>	BD Bioscience, Bedford, USA
Elektronische Präzisionswaage, <i>Basic lite BL3100</i>	Sartorius, Göttingen, Deutschland
<i>Electrophoresis-Constant-Power-Supply</i> , Netzgerät Typ <i>PowerPacHC™</i>	BioRad, München, Deutschland
Entwickler, <i>Curix 60</i>	Agfa AG, Mortsel, Belgien
Fluoreszenzmikroskop, <i>Axiovert 200M</i>	Carl Zeiss Mikroskopie, Oberkochen, Deutschland
Gasbrenner, Typ <i>Flammy S</i>	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Gelständler, Glasplatten	Bio-Rad, Hercules, USA
Heizbarer Magnetrührer, Typ <i>MR3001</i>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Heizblock <i>Dry Block Heating Thermostat</i> , Typ <i>BioTDB-100</i>	Biosan, Riga, Lettland
Immunoblot- und Transferkammer, Typ <i>Mini-PROTEAN®3 cell</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
Inkubationswippe, <i>Polymax 1040</i>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Konfokalmikroskop, <i>LSM 510 Laser Scanning Microscope Zeiss Axiovert 200</i>	Carl Zeiss Mikroskopie, Oberkochen, Deutschland
Kühlschrank (4 °C), <i>Liebherr premium</i>	Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH,

Lichtmikroskop	Ochsenhausen, Deutschland Carl Zeiss Mikroskopie, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop für Immunfluoreszenz, Typ <i>Axiovert 200</i>	Carl Zeiss Mikroskopie, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop, Typ <i>Axiovert 40</i>	Carl Zeiss Mikroskopie, Oberkochen, Deutschland
Mixer, Typ <i>Vortex-Genie 2TM</i>	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Netzgerät für die Elektrophorese, <i>Elite 300 Plus</i>	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
PH-Meter, <i>inoLab Level 3</i>	Wissenschaftlich-technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
PH-Meter, <i>MR 3001</i>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Photometer, Typ <i>Biophotometer</i>	Eppendorf-Netheler GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe, <i>Accu-Jet[®]</i>	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettierhilfe, <i>Pipetus[®]</i>	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Real Time-PCR-Gerät, <i>7500 Real Time PCR System</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
Spektrophotometer, <i>NanoDrop ND-1000 Full-spectrum UV/Vis spectrometer</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sterilbank, <i>HS18, Klasse II</i>	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Tiefkühlschrank (-20 °C), <i>Liebherr premium no frost</i>	Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Tiefkühlschrank (-80 °C), <i>Hera freeze HFU 586Top</i>	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge, Typ <i>5415R, MiniSpinPlus</i>	Eppendorf-Netheler GmbH, Hamburg, Deutschland
Wasserbad, <i>LAUDA A100</i>	Lauda, Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, Deutschland
Zentrifuge, <i>Mini-Spin Plus</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge, <i>Multifuge 15-R</i>	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge, Typ <i>5415R</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermocycler, <i>Mastercycler epigradient</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.3 Chemikalien

Tabelle 2.3-1: Liste verwendeter Chemikalien (in alphabetischer Reihenfolge)

Produkt	Hersteller
0,05 % Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

3-Methyladenin	Sigma, St. Louis, USA
Ammoniumpersulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>BCA Protein Assay</i> (A, B)	Thermo Scientific Pierce Protein Research, Rockford, USA
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BSA (Rinderserumalbumin)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloroquin	Sigma, St. Louis, USA
Cycloheximid	Sigma, St. Louis, USA
DAPI (6-diaminidino-2-phenylindole, dihydrochloride), $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5$	Molecular Probes, Invitrogen detection technologies, Eugene, USA
Dinatriumphosphat, Na_2HPO_4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid), $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
dNTP-Mix für reverse Transkriptase (10 mM) aus 4 Nukleotid-Lösungen aus dem 100 nM dNTP-Set von Invitrogen angesetzt	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DTT (Dithiothreitol), 0,1 M, $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	PAA, Pasching, Österreich
FCS (Fetales Kälberserum)	Southern Biotech, Alabama, USA
Fluoromount-G	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin, wasserfrei, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin, $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanesulfonsäure)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid, KCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Laemmli Proben-Puffer	Bio-Rad, Hercules, USA
Methanol, CH_3OH	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mounting Medium (Mowiol [®])	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, Deutschland
Nanofektin I	PAA, Pasching, Österreich
Natriumchlorid, NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Gibco, Karlsruhe, Deutschland

NP40 (<i>NonidetP40 Substitute</i>)	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Oligo-dT-Primer für Reverse Transkriptase, <i>Anchored Oligo-dT</i>	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
PBS (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)	Invitrogen, Carlsbad, USA
PFA (Paraformaldehyd), 32 %ige Lösung	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, UK
Ponceau-S-Lösung, 0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<i>Prolong Gold Antifade</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Proteaseinhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Rapamycin	Sigma, St. Louis, USA
RNase A	Qiagen Inc., Valencia, USA
Rotiphorese® Gel 30, 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel B 2 % Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, HCl, 32 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Saponin	Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK
SDS Ultra Pure, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Succofin Magermilchpulver	TSI-GmbH, Zeven, Deutschland
Supermix für Real Time-PCR mit Sonde (2×), Platinum® qPCR SuperMix-UDG 2×	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (Tetramethylethyldiamin), C ₆ H ₁₆ N ₂	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TO-PRO-®3 Jodid	Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, USA
Tris Ultra, C ₄ H ₁₁ NO ₃	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Fisher Biotech, Wembley, Australia
Trypanblau	Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK
Trypsin (0,05 % Trypsin/EDTA)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Tween20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
UltraPure destilliertes Wasser (DNase/RNase frei)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Superscript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.4 Puffer

Tabelle 2.4-1: Liste verwendeter Puffer mit Rezeptur (in alphabetischer Reihenfolge)

Puffer	Rezeptur
1× PBS-Puffer	100 ml 10× PBS-Puffer <i>ad</i> 1000 ml dH ₂ O
1× TBS-Puffer	100 ml 10× TBS <i>ad</i> 1000 ml dH ₂ O
1× Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol <i>ad</i> H ₂ O pH 8,3
1× Elektrophorese-Puffer/Western-Blot-Puffer	200 ml 5× Elektrophorese-Puffer <i>ad</i> 1000 ml dH ₂ O
10× PBS-Puffer	1,3 M NaCl 26,8 mM KCl 33,8 mM Na ₂ HPO ₄ 0,1 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O <i>ad</i> bidest. H ₂ O pH 6,7
10× Probenauftragspuffer für SDS-PAGE Gelelektrophorese (PAGE-Puffer)	0,127 mM Tris-HCl 0,1 % Bromphenolblau 4 % SDS 20 % Glycerol 10 % 2-Mercaptoethanol pH 6,8
10× TBS-Puffer	0,2 M Tris 1,4 M NaCl <i>ad</i> H ₂ O pH 7,6
4× Tris-HCl/SDS	0,5 M Tris-Cl 0,4 % SDS <i>ad</i> H ₂ O pH 6,8
5× Elektrophorese-Puffer/Western-Blot-Puffer	15 g Tris 100 g Glycin 5 g SDS <i>ad</i> 1000 ml dH ₂ O
Blockierungslösung (für Western Blot)	1 % BSA in TBS-Tween-Puffer (1 g <i>ad</i> 100 ml) oder 5 % Magermilchpulver (5 g <i>ad</i> 100 ml) in TBS-Tween-Puffer

DNA-Extraktionspuffer	192 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ 8 ml 0,1 % Triton X-100 pH 7,8
FACS-Puffer	1,5 % FCS 0,1 % Natriumazid in PBS
Lyse-Puffer (zur Aufreinigung zytosolischer Proteine)	952 mg HEPES 1 M NaCl 0,05 M EDTA 1 % NP40 ad 300 ml dH ₂ O pH 7,9
TBS-Tween	1000 ml 10× TBS-Puffer 0,1 % Tween 20
First Strand Buffer (5×) für Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.5 Medien

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

Tabelle 2.5-1: Liste verwendeter Medien (in alphabetischer Reihenfolge)

Medium	Rezeptur / Hersteller
DMEM für die Rhabdomyosarkom-Zelllinie CCL136	10 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % Glutamin mit DMEM mit 4,5 g Glukose/500 ml auffüllen sterilfiltrieren
DMEM für die Muskelzellkultur	10 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % Glutamin 0,5 % Hühnchenembryoextrakt mit DMEM mit 4,5 g Glukose/500 ml auffüllen sterilfiltrieren
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM mit 4,5 g Glukose/500 ml)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Einfriermedium	hitzeinaktiviertes FCS 10 % DMSO sterilfiltrieren
<i>Skeletal Muscle Cell Growth Medium</i> für die Primärmuskelzellkultur	Provitro, Berlin, Deutschland
X-VIVO 15 (serumfrei)	Lonza, Verviers, Belgien

2.6 Antikörper und Farbstoffe

Tabelle 2.6-1: Liste verwendeter Antikörper und Farbstoffe (in alphabetischer Reihenfolge)

Produkt	Hersteller
Alexa Fluor® 555 Pure Ziege Anti-Maus IgG (H+L)	Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, USA,
FITC-konjugierter Anti-human HLA-A, -B, -C	BD Biosciences, Bedford, USA
HRP-konjugiertes Affini Pure Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L)	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
HRP-konjugiertes Ziege Anti-Maus IgG	Bio-Rad, Hercules, USA
IgG _{1κ} Isotyp-Kontrolle (HLA-A,-B,-C)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
IgG _{2aκ} Isotyp-Kontrolle (HLA-DR)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Kaninchen Anti-LC3 Antiserum	Prof. Christian Münz, Zürich, Schweiz
N-terminales Peptid (LC3 ₁₋₁₅) MPSEKTFKQRRTFEQR	
Maus Anti-human β-Amyloid ₁₋₁₇ , 6E10, monoklonal (Primärantikörper für Immunoblotting)	Covance bezogen von Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg, Deutschland
Maus Anti-LC3, monoklonal	Nanotools, Teningen, Deutschland
Maus Anti-β-Aktin, monoklonal (Primärantikörper für Immunoblotting)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
PE-konjugierter Anti-human HLA-DR-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Rhodamine Red-X-konjugiertes Esel Anti-Maus IgG	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
ROX Referenz-Farbstoff	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
ThioflavinS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2.7 siRNA

Tabelle 2.7-1: Liste verwendeter siRNA (in alphabetischer Reihenfolge)

Produkt	Hersteller
ATG12 siRNA (validiert)	Qiagen Inc., Valencia, USA
Hs_APG12L_5_HP Validated siRNA	
Zielsequenz: CTC AGA ACA GTT GTT TAT TTA	
Sense: r(CAG AAC AGU UGU UUA UUU A)dTdT	
Antisense: r(UAA AUA AAC AAC UGU UCU G)dAdG	
<i>Silencer</i> ® Negative Control siRNA	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.8 Primer Proben

Tabelle 2.8-1: Liste verwendeter Primer Proben (in alphabetischer Reihenfolge)

Produkt	Hersteller
GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase), Assay ID Hs99999905_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
ATG12 (Autophagy-related gene 12), Assay ID Hs00740818_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.9 Antibiotika

Eingesetzt als 1 %-Lösung in den Zellkulturmedien.

Tabelle 2.9-1: Liste verwendeter Antibiotika (in alphabetischer Reihenfolge)

Produkt	Hersteller
Penicillin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.10 Zytokine

Tabelle 2.10-1: Liste verwendeter Zytokine (in alphabetischer Reihenfolge)

Produkt	Hersteller
GM-CSF, rekombinant	Immunex, Seattle, USA
IL-1 β , rekombinant	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-12, rekombinant	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-4, rekombinant	PeptoTech, Rocky Hill, USA
IL-8, rekombinant	R&D Systems, Minneapolis, USA
IFN- γ , rekombinant	Chemicon International Inc., Temecula, USA
IP-10, rekombinant	R&D Systems, Minneapolis, USA
MCP-1, rekombinant	R&D Systems, Minneapolis, USA
TNF- α , rekombinant	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.11 Längenstandard und Kits

Tabelle 2.11-1: Verwendeter Längenstandard und Kits für Immunoblot (in alphabetischer Reihenfolge)

Produkt	Hersteller
<i>Blot Restore Solution A und B</i>	Chemicon/Millipore, Schwalbach, Deutschland
Chemilumineszenz Substrat, <i>Chemi Glow™ West</i>	Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA
<i>Precision Plus Protein™ Dual color Standards</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
<i>RNeasy® Mini Kit</i>	Qiagen Inc., Valencia, USA

2.12 Primäre Zellkulturen und Zelllinien

Tabelle 2.12-1: Verwendete Zellen (in alphabetischer Reihenfolge)

Produkt	Hersteller
CCL136-Zellen (humane Rhabdomyosarkom-Zelllinie)	ATCC, Manassas, USA
GFP-LC3 ⁺ -CCL136-Zellen	Prof. Christian Münz, Zürich, Schweiz
HaCat-Zellen (humane Keratinozyten-Zelllinie)	Dr. Rajiv Khanna, Brisbane, Australien
Leukozytenkonzentrate	New York City Blood Center (Blutbank), New York, USA
MDAMC-Zellen (humane Mammakarzinom-Zelllinie)	Dr. Irene Joab, Paris, Frankreich
Primärmuskelzellen	PromoCell, Heidelberg, Deutschland Muskelbiopsien

2.13 Software

Tabelle 2.13-1: Verwendete Software (in alphabetischer Reihenfolge)

Produkt	Hersteller
<i>Adobe Illustrator CS</i> , Software zum Erstellen von Abbildungen	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
<i>Adobe Photoshop CS</i> , Software zur Bildbearbeitung	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
<i>Cell Quest™ Pro</i> Version 5.1.1, Software für Durchflusszytometrie	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
<i>EndNote</i> Version X1.0.1, Literaturverwaltung, Bibliographieerstellung und Online-Recherche	Thomson Reuters, New York, USA
<i>Epson Smart Panel</i> , Software zum Einscannen	Epson Corporation, Long Beach, USA

von Bildern und Western Blots

FlowJo, Software zur Auswertung der

Tree Star, Ashland, USA

Durchflusszytometrie

Graph Pad Prism 4.03

Graph Pad Software Inc., La Jolla, USA

Image-Pro[®]MDA Version 5.1.2.59, Software zur
Aufnahme von Bildern am Fluoreszenzmikroskop

Media Cybernetics, Inc., Bethesda, USA

Irfan view, Software zum Invertieren von Bildern

Irfan Skiljan, Wien, Österreich

LSM 510 Confocal Software, Software zur
Aufnahme von Bildern am Konfokalmikroskop

Carl Zeiss Mikroskopie, Oberkochen,
Deutschland

Microsoft[®]*Excel* 2002

Microsoft Corporation, Redmont, USA

Microsoft[®]*Office* 2003

Microsoft Corporation, Redmont, USA

Nano Drop ND-100 Version 3.1.2, Software zur
Messung von RNA-Konzentration

Coleman Technologies Inc., Orlando, USA

Scion Image, Software für Grauskalenanalyse

Scion Corporation, Maryland, USA

Sequence-Detektion Software Version 1.3.1,

Applied Biosystems, Foster City, USA

7500 System SDS-Software, Software für die
Real Time-PCR und deren Auswertung

*Windows Multiple Document Interface for Flow
cytometrie (WinMDI)*, Software zur Auswertung
der Durchflusszytometrie

The Scripps Research Institute, West Palm
Beach, USA

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Grundlagen der Arbeit mit Zellkulturen

Um die Kontamination der verwendeten Zellen mit Bakterien und Pilzen zu verhindern, erfolgte das Arbeiten mit Zellkulturen unter sterilen Bedingungen. Sämtliche zellbiologische Methoden wurden unter einer Sterilbank der Sicherheitsklasse 2 durchgeführt. Alle verwendeten Materialien und Geräte wurden vor Gebrauch autoklaviert oder hitzesterilisiert. Die Kultivierung sämtlicher Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % in feuchter Atmosphäre (95 %). Die verwendeten Zelllinien besitzen eine reguläre Verdopplungszeit von etwa 24 h.

3.1.2 Kultivierung von adhärennten Zellen

Sämtliche adhärennt wachsenden Zelllinien (CCL136, HaCat, MDAMC) wurden in DMEM-Medium (4,5 % Glukose) mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Glutamin kultiviert. Primärmuskelzellkulturen wurden in DMEM-Medium (4,5 % Glukose) mit 10 % FCS, 0,5 % Hühnchenembryoextrakt, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Glutamin bzw. in Primärmuskelzellkulturmedium (*Skeletal muscle cell growth medium*) der Firma Provitro kultiviert. Das Ablösen der Zellen erfolgte nach einmaligem Waschen der Kulturflaschen mit warmem 1× PBS und Inkubation bei 37 °C in warmem Trypsin (0,05% Trypsin-EDTA) über 1 Min in frischem Medium. Um unspezifische Effekte zu minimieren, wurden die Zellen während aller Experimente in serumfreiem Medium (X-Vivo) kultiviert.

Die Kultivierung erfolgte in sterilen Kulturflaschen (75 cm²) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 %iger Luftfeuchtigkeit. Etwa alle 72 h wurden die Zellen mit warmem und sterilem PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin (0,05 % Trypsin-EDTA) abgelöst. Die Reaktion wurde mit 8 ml warmem Kulturmedium terminiert. Danach wurde 1 ml dieser Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt und mit 11 ml Medium aufgefüllt, um die Zelllinie auf diese Weise weiterzuführen.

Für die jeweiligen Experimente wurden je nach verwendeter Versuchsanordnung (6-, 12-, 24-Well-Platte bzw. 8-Kammer-Objektträger) definierte Zellzahlen pro Well bzw. Kammer verwendet. Hierfür wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die jeweilige Zellzahl gewährleistete eine Konfluenz der Zellen von ca. 70 bis 80 % nach 72 h.

Tabelle 3.1.2-1: Verwendete Zellzahl pro Well bzw. Kammer

Platte	Zellzahl
6-Well-Platte	90000
12-Well-Platte	45000
24-Well-Platte	22500
8-Kammer-Objektträger (Chamberslides)	5000

Für die jeweiligen experimentellen Anordnungen wurde die Zellsuspension entweder in 6-, 12-, bzw. 24-Well-Platten oder 8-Kammer-Objektträger (engl. *Chamberslides*) überführt. Sobald die Zellen nach ca. 72 h 70 %ige Konfluenz erreichten, fanden Transfektionen oder die Exposition gegenüber Zytokinen statt. Während des jeweiligen Experimentes wurden die Zellen in serumfreiem Medium (X-Vivo) kultiviert. Je nach verwendetem Kulturgefäß wurden unterschiedliche Mengen an Medium verwendet.

Tabelle 3.1.2-2: Verwendetes Mediumvolumen pro Well bzw. Kammer

Platte	Volumen in ml
6-Well-Platte	2
12-Well-Platte	1
24-Well-Platte	0,5
8-Kammer-Objektträger (Chamberslides)	0,3

3.1.3 Bestimmung von Zellvitalität und Zellzahl

Die Zellvitalität wurde mittels Trypanblau bestimmt. Hierzu wurden 10 µl der entsprechenden Zellsuspension zusammen mit 10 µl Trypanblau in einem Well einer 96-Well-Platte gemischt. Bei Trypanblau handelt es sich um einen anionischen Diazofarbstoff, welcher von vitalen Zellen nicht aufgenommen werden kann. Tote Zellen hingegen werden von Trypanblau durchdrungen und durch den Farbstoff blau angefärbt. Da Trypanblau zytotoxisch ist, muss die Auszählung in direktem Anschluss erfolgen. Die Anzahl vitaler Zellen (z) wurde durch Auszählen der nicht angefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Hierzu wurden 25 Quadrate der Zählkammer ausgezählt.

$$[\text{Berechnung: } z \times 2 \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}]$$

3.1.4 Gefrierkonservierung von Myoblasten

Zur Konservierung wurden Myoblasten in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden die Zellen mit 0,05 % Trypsin-EDTA wie bereits beschrieben aus der Kulturflasche abgelöst und in frischem Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension abzentrifugiert

(300 x g, 5 min, 4 °C). Eine Zellzahl von $2 - 10 \times 10^6$ Zellen/ml wurde mit Einfriermedium (hitzeinaktiviertes FCS + 10 % DMSO) versetzt. Zum Einfrieren wurde je 1 ml der Zelllösung in ein vorgekühltes Kryokonservierungsröhrchen überführt und 24 h bei -80 °C eingefroren. Die weitere Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3.1.5 Auftauen von Zellen

Die in Kryoröhrchen gefrierkonservierten Zellen wurden für kurze Zeit in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt, bis die Zellsuspension fast vollständig aufgetaut war. Anschließend wurde diese in 10 ml erwärmtes Kulturmedium überführt, um das zelltoxische DMSO zu verdünnen. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 5 Min, RT), das Pellet in warmem Medium resuspendiert und in einer Gewebekulturflasche (75 cm²) mit 12 ml Medium im Brutschrank kultiviert.

3.1.6 Anlegen und Kultivierung der Primärmuskelzellkultur

Primäre humane Myoblasten wurden kryokonserviert von der Firma PromoCell (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Eine frische Kulturflasche (75 cm²) wurde mit 15 ml sterilem Kulturmedium (*Skeletal muscle cell growth medium*) beschickt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 30 min vorinkubiert. Währenddessen wurden die kryokonservierten Zellen in ein Wasserbad (37 °C) gegeben und daraufhin gewartet, bis etwa 90 % des Inhaltes langsam aufgetaut waren. Danach wurde das Kryogefäß aus dem Wasserbad entfernt und unter vorsichtigem Schütteln bei Raumtemperatur der verbliebene Inhalt aufgetaut. Der Verschluss des Kryogefäßes wurde mit 70 %igem Ethanol gereinigt, um eine Kontamination durch Bakterien oder Pilze zu vermeiden. Nach Abdampfen des Ethanols wurde das Kryogefäß unter einer Sterilbank geöffnet. Die Zellsuspension wurde nun in die vorinkubierte Kulturflasche überführt und diese in den Brutschrank gegeben. Nach 24 h wurde die Adhärenz der Zellen überprüft und ein Mediumwechsel durchgeführt. In Kultur erfolgte ein Mediumwechsel alle 72 bis 96 h. Bei einer Konfluenz von 40 bis 50 % wurden die Zellen mittels 0,05 % Trypsin-EDTA abgelöst und auf zwei Kulturflaschen aufgeteilt, um eine frühzeitige Differenzierung auf Grund von zu engem Zell-Zell-Kontakt zu vermeiden. Diese Subkultivierung verbessert die Überlebensfähigkeit und Vermehrung der Myoblasten.

3.1.7 Exposition der Myoblasten gegenüber proinflammatorischen Zytokinen

Die Zellen wurden in 6-, 12- bzw. 24-Well-Platten oder in 8-Kammer-Objekträgern bis zu einer Konfluenz von 60 bis 70 % kultiviert. Hiernach wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellen mit warmem 1x PBS gewaschen. Die entsprechenden Zytokine wurden in X-Vivo verdünnt und in die jeweiligen Wells bzw. Kammern gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Zytokinen bei 37 °C für den gewünschten Zeitraum inkubiert.

Im Anschluss wurde das Medium entfernt, die Zellen mit warmem 1× PBS gewaschen und entsprechend der verwendeten Methode weiterverarbeitet.

3.1.8 Exposition von Myoblasten gegenüber Inhibitoren/Induktoren

Zunächst wuchsen die Zellen bis zu einer Konfluenz von 60 - 70 %. Im Anschluss an die unter *Punkt 3.1.7* beschriebene Zytokinbehandlung wurden die in *Tabelle 3.1.8-1* aufgelisteten Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen in X-Vivo verdünnt zu dem Medium gegeben und entsprechend der verwendeten Methode weiterverarbeitet.

Tabelle 3.1.8-1: Verwendete Inhibitoren/Induktoren für *in-vitro*-Experimente

Inhibitor/Induktor	Hersteller	Stockkonzentration	Endkonzentration
3-Methyladenin	Sigma, St. Louis, USA	100 mM	10 mM
Chloroquin	Sigma, St. Louis, USA	10 mM	50 µM
Cycloheximid	Sigma, St. Louis, USA	10 mM	1 µg/ml
Rapamycin	Sigma, St. Louis, USA	1 µg / µl	1 µg/ml

3.2 Immunbiologische Methoden

3.2.1 Immunzytochemie

Im Rahmen immunzytochemischer Methoden erfolgt der Nachweis von Zell- und Gewebekomponenten mit Antigencharakter unter Anwendung einer Antigen-Antikörperreaktion. Zielstrukturen (Antigene), welche mit histochemischen Färbemethoden nicht detektiert werden können, werden somit durch entsprechende Bindung mit einem farbmarkierten Antikörper visualisiert.

Nach Ablauf der jeweils gewünschten Inkubationszeit wurde das Medium vollständig aus den Kammern entfernt und die Zellen zweimal mit warmem 1× PBS gewaschen. Anschließend wurde die Kammer entsprechend den Herstellerangaben abgelöst. Um nachfolgend eine Begutachtung der Objektträger mittels Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen, erfolgte nun eine Fixierung (s. u.). Sollte nur das GFP-Signal der GFP-LC3⁺ CCL136-Zellen detektiert werden, konnten die Objektträger nach der Fixierung mit *Prolong Gold Antifade* eingedeckt und hiernach unter dem Mikroskop betrachtet werden. Bei immunzytochemischen Färbungen mittels spezifischer Antikörper erfolgten diese im Anschluss an die Fixierung.

3.2.1.1 Fixierung

Nach 10 Min Lufttrocknung der Objektträger erfolgte eine 10 Min Fixierung derselben in 4 % PFA bei RT. Es folgte dreimaliges Waschen in 1× PBS.

Bei den immunzytochemischen Färbungen mit ThioflavinS wurde eine PFA-Methanol-Kofixierung durchgeführt, welche einen optimalen Erhalt der Zellmorphologie gewährleistet. Hierbei wurden die Objektträger im direkten Anschluss an den letzten Waschschrift nach PFA-Fixierung über 10 Min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Methanol fixiert. Drei Waschschriffe in 1× PBS schlossen sich an.

3.2.1.2 Permeabilisierung

Im Anschluss an den letzten Waschschrift erfolgte eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,1 % Triton-X-100 in PBS für 5 Min. Daraufhin wurden die Zellen erneut einem zweimaligem Waschschrift in 1× PBS unterzogen.

3.2.1.3 Blockierung

Es folgte eine 30-minütige Blockierung mit einem 1 : 1 Gemisch aus 10 % BSA und 100 % Ziegenserum in PBS, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren.

3.2.1.4 Immunzytochemische Färbung mittels Maus Anti-LC3-Antikörper

Nach der Blockierung erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Primärantikörper. Dieser Primärantikörper (Stockkonzentration 100 µg/ml) wurde in einem 1 : 100 Verhältnis mit 5 % Ziegenserum und 0,1 % Saponin in PBS verdünnt. Diese Verdünnung wurde anschließend bei 13000 RPM für 20 Min zentrifugiert, um etwaige Aggregate zu pelletieren. Pro Kammer wurden 200 µl der Verdünnung aufgetragen und für 30 Min bei RT inkubiert. Nach Abnahme des Primärantikörpers folgten drei Waschschriffe über jeweils 5 Min mit 0,1 % Saponin in PBS (Abk. PBSS). Der Sekundärantikörper (Alexa Fluor[®]555 Ziege Anti-Maus IgG) wurde in einem Verhältnis von 1 : 300 mit 5 % Ziegenserum und 0,1 % Saponin in PBS verdünnt. Auch diese Verdünnung wurde anschließend bei 13000 RPM für 20 Min zentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl der Verdünnung pro Kammer aufgetragen und bei RT für 30 Min inkubiert. Nach Abnahme des Sekundärantikörpers wurden für 30 Sek 200 µl einer 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Verdünnung (1 : 50000) zwecks Kerngegenfärbung aufgetragen. Es folgten zwei weitere Waschschriffe in PBSS. Danach wurden die Objektträger kurz getrocknet, mit *Prolong Gold Antifade* eingedeckt und bis zur Auswertung via Fluoreszenzmikroskop im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

3.2.1.5 ThioflavinS

Mit Hilfe der ThioflavinS-Färbung erfolgte der Nachweis von β -Amyloid-Aggregaten. ThioflavinS ist ein Benzothiazolsalz, welches spezifisch β -Faltblattstrukturen bzw. Aggregate aus β -Faltblattanordnungen fluoreszierend anfärbt. Hierbei verhält sich das Reagenz ähnlich dem Kongorot im Rahmen der Histochemie. Das Reagenz wird standardmäßig als immunfluoreszenter Nachweis von β -Amyloidplaques in der Alzheimerforschung verwendet und wurde in der Vergangenheit zusätzlich zur Detektion intrazellulärer β -Amyloideinschlüsse in der Muskelforschung etabliert (BUSSIERE et al. 2004).

Die Objektträger wurden mittels PFA-Methanol-Kofixation fixiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift über jeweils 2 Min in dH₂O. Hiernach wurden die Objektträger über 5 Min mit 1 % ThioflavinS in dH₂O inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger für 5 Min in 70 % Ethanol inkubiert und erneut dreimal über jeweils 2 Min in dH₂O gewaschen. Die darauffolgende DAPI-Kernfärbung (1 : 50 000) erfolgte über 30 Sek. Nach zwei weiteren Waschschriften in dH₂O wurden die Objektträger mit Fluoromount-G eingedeckt und bei RT im Dunkeln gelagert. Nach 6 - 24 h schloss sich die fluoreszenzmikroskopische Analyse an. Hierzu wurde der Fluoreszinisothiocyanat (FITC)-Filter zur Detektion des ThioflavinS-Signals verwendet.

Tabelle 3.2.1.5-1: Farbstoffe, die für immunzytochemische Untersuchungen verwendet wurden sowie deren entsprechende Filter.

Farbstoff	Filter	Anregungs- wellenlänge [λ]	Emissions- wellenlänge [λ]
Alexa Fluor [®] 555	Texas Red	555 nm	565 nm (rot)
ThioflavinS	FITC	495 nm	519 nm (grün)
DAPI	DAPI	359 nm	461 nm (blau)
(E)GFP	FITC	488 nm	509 nm (grün)

Tabelle 3.2.1.5-2: Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten für die Immunzytochemie

Name	Spezies	Verdünnung	Inkubation
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)	-	1 : 50 000	30 Sek, RT
ThioflavinS	-	1 : 100	5 Min, RT
LC3	Maus	1 : 100	30 Min, RT

3.2.1.6 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Für die Visualisierung und Analyse der ThioflavinS-Färbungen wurde das Fluoreszenzmikroskop *Axiovert 200 M* unter Verwendung von 20× oder 40× Objektiven benutzt. Filtereinstellungen wurden entsprechend der Emissionswellenlänge des jeweiligen Farbstoffes verwendet (vgl. *Tabelle 3.2.1.5-1*). Alle Aufnahmen erfolgten mit einer hochsensitiven CCD-Kamera der Firma *Intas*, wobei die jeweiligen Einstellungen für einen experimentellen Ansatz konstant gehalten wurden. Hinsichtlich der Grauwertanalyse wurden alle Aufnahmen zunächst mit dem Programm *Irfan view* invertiert und anschließend mittels *Scion Image* die medianen Grauwerte bestimmt. Pro Gruppe wurden jeweils mindestens vier Aufnahmen (20× Objektiv) analysiert. Die statistische Auswertung wurde entweder mit *GraphPad Prism* oder *Microsoft® Excel 2003* durchgeführt.

Die Aufnahmen der GFP-LC3⁺ CCL136-Zellen sowie die immunzytochemischen Färbungen der primären humanen Myoblasten mit dem monoklonalen Maus Anti-LC3-Antikörper wurden mit Hilfe des invertierten LSM 510 Konfokalmikroskops (*Zeiss Axiovert 200*) unter Benutzung von 63× bzw. 100× Objektiven (Ölimmersion) angefertigt. Alle Aufnahmen wurden mit der *LSM 510 Confocal Software* (Zeiss) aufgenommen.

3.2.2 Proteinnachweis mittels Immunoblot

Der Immunoblot ermöglicht die Identifizierung und den semi-quantitativen Nachweis spezifischer Proteine. Dieser Nachweis erfolgt durch eine initiale Auftrennung eines zu untersuchenden Proteingemisches in der Gelelektrophorese über den Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran bis hin zur eigentlichen Proteindetektion mittels Antigen-Antikörperreaktion.

3.2.2.1 Zellyse zur Proteingewinnung

Zunächst wurde das Medium aus den 6-Well-Platten entfernt. Es folgten zwei Waschschriffe mit 1× PBS über jeweils 5 Min. Alle darauffolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Vor jeder Proteinlyse wurde der Lysepuffer (siehe Material) frisch mit einem Proteaseinhibitor (Abk. PI) versetzt. 200 µl des Lysepuffer-PI-Gemischs wurden pro Well aufgetragen und auf Eis für 30 Min inkubiert. Danach wurde die Puffer-Zell-Suspension mit einer Pipette auf- und abpipettiert, um die adhärenen Zellen vollständig von der Welloberfläche zu lösen. Verbliebene Zellen wurden mittels Zellschaber abgelöst. Der Inhalt der Wells wurde in Reaktionsgefäße überführt und für 10 Min bei 10000 RPM und 4 °C abzentrifugiert. Die hierdurch gewonnenen Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurde entweder unmittelbar eine Proteinbestimmung durchgeführt oder aber die Lysate bei -20 °C gelagert.

3.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch nach Bradford (BRADFORD 1976) bestimmt. Hierzu wurde zunächst eine Standardverdünnungsreihe mit BSA in 1× PBS (0 - 500 µg/ml) angelegt, um das Photometer zu kalibrieren. Es folgte eine photometrische Analyse der Proben unter Verwendung einer 1 : 20 Verdünnung des Zellysates. Die Extinktion wurde photometrisch bei 595 nm Wellenlänge gemessen. Nach erfolgter Proteinmengenbestimmung wurden die Proben mit gleichem Volumen eines 2× Laemmli Proben-Puffers versetzt und bei 98 °C über 5 Min erhitzt. Anschließend wurden die Proben entweder in Gelkammern aufgetragen oder bei -20 °C gelagert.

3.2.2.3 Auftrennung von Proteinen über SDS-Gelelektrophorese

Unter der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) versteht man ein Verfahren, welches der Auftrennung von Proteinen gemäß ihrem Molekulargewicht dient. Bei Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, Abk. SDS) handelt es sich um ein anionisch und damit negativ geladenes Detergens. Durch Hinzufügen von SDS zu einer Proteinprobe werden die auf hydrophoben Wechselwirkungen basierenden Bindungen innerhalb eines Proteins aufgehoben. Dies führt zu einem Verlust der höhergradigen Proteinstrukturen (Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur) mit Übergang des Proteins in seine linearisierte Form. Eine weitere Denaturierung der Proteine wird durch die im Laemmli Proben-Puffer enthaltenen niedermolekularen Thiole (wie beispielsweise β -Mercaptoethanol) erreicht, welche eine Reduktion der Disulfidbrückenbindungen in den Polypeptidketten verursachen. Das an die Proteine angelagerte, stark negativ geladene SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine. Im Rahmen der gelelektrophoretischen Auftrennung eines Proteingemischs wandern somit alle Proteine zur Anode. Hierbei ist die Laufgeschwindigkeit der denaturierten Proteine umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht. Polyacrylamid ist ein wesentlicher Bestandteil des bei der SDS-PAGE eingesetzten Gels. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein aus Acrylamidmonomeren bestehendes Polymer. Durch N,N'-Methylenbisacrylamid werden die Acrylamidmonomere quervernetzt mit konsekutiver Bildung eines dreidimensionalen Netzwerks. Durch Steigerung des Vernetzungsgrads mittels erhöhter Acrylamidkonzentration lassen sich auch kleinere Proteine auftrennen. Bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese unterscheidet man zwischen Sammelgel und Trenngel. Nach Auftragen der Proteinproben in die entsprechenden Geltaschen passieren die Proteine zunächst das Sammelgel, in welchem sie aufgrund eines pH-Unterschieds vor Eintritt in das Trenngel zu einer scharfen Bande fokussiert werden. Dies hat zur Folge, dass alle Proteine nahezu gleichzeitig in das Trenngel einwandern, was zu einer hohen Schärfe der späteren Proteinbanden sowie einer optimalen Transfereffizienz führt. Zur Herstellung der Gele sowie zur Trennung der Proteine wurden Minigelsysteme der Firma *Bio-Rad*

verwendet. Ein Acrylamid-Anteil von 12 % wurde für die Gele gewählt. Die Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele ist in *Tabelle 3.2.2.3-1* aufgelistet.

Tabelle 3.2.2.3-1: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels

Komponenten	Trenngel (12 %)	Sammelgel
Acryl-Bisacrylamid-Lösung	2 ml	0,17 ml
Trenngel-Puffer (1,5 M Tris, pH 8,8)	1,3 ml	-
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, pH 6,8)	-	1,3 ml
10 % SDS	0,05 ml	0,01 ml
Ammoniumpersulfat (APS)	0,05 ml	0,01 ml
dH ₂ O	1,6 ml	0,68 ml
TEMED	0,002 ml	0,001 ml

Die Polymerisierung des Acrylamids wird durch den Radikalbildner Ammoniumpersulfat (Abk. APS) gewährleistet. Tetramethylethylenediamin (Abk. TEMED) diente als Polymerisierungskatalysator. Alle Glasplatten des Gelsystems wurden vor Gebrauch mittels Isopropanol von Rückständen befreit. Nach Zusammenbau des Gelsystems wurde zunächst das Trenngel eingegossen. Ein Abstand von ca. 2 cm zum Oberrand des Systems wurde belassen. Der Freiraum zwischen Trenngel und Oberkante wurde nun mit Isopropanol aufgefüllt, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Nach ca. 20 Min war eine vollständige Auspolymerisierung des Trenngels erreicht. Das Isopropanol wurde abgenommen, der über dem Trenngel befindliche Raum mit saugfähigem Papier getrocknet und danach das Sammelgel aufgetragen. Nun wurde ein Elektrophoresekamm mit zehn Zinken in das noch flüssige Sammelgel gegeben. Nach vollständiger Auspolymerisierung des Sammelgels wurde das Gel in die Trennkammer eingesetzt und der Kamm vorsichtig entfernt. Die hierdurch entstandenen Geltaschen wurden vor der Elektrophorese mit Elektrophoresepuffer ausgespült. Die Trennkammer wurde sowohl auf der Seite der Anode als auch auf Seite der Kathode mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Zur Auftrennung des Proteingemisches wurden jeweils 10 µl der Proben (ca. 20 ng Proteinmenge) mit einer 50 µl Hamiltonspritze aufgetragen. Um später das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können, wurden pro Gel 8 µl eines Molekulargewichtsstandards (*Precision Plus Protein Standard*) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V und wurde gestoppt, sobald die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

3.2.2.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Nach erfolgter Auftrennung der Proteine durch die Gelelektrophorese erfolgte die Übertragung der Banden auf eine Nitrozellulosemembran. Zunächst wurde das Gel aus den Glasplatten gelöst und in Transferpuffer für 10 Min vorinkubiert.

Tabelle 3.2.2.4-1: Aufbau der Transferkammer

Aufbau der Transferkammer	Orientierung
poröser Schwamm	Anodenplatte
Gel Blotting-Papier	-
Nitrozellulosemembran	-
SDS-Polyacrylamid-Gel	-
Gel Blotting-Papier	-
poröser Schwamm	Kathodenplatte

Durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 1 h wurden die Proteine durch ein senkrecht zum Polyacrylamidgel verlaufendes elektrisches Feld auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

3.2.2.5 Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulosemembranen

Mit Hilfe des roten Azofarbstoffs Ponceau S kann der Nachweis eines erfolgreichen Proteintransfers erbracht werden. Die Substanz bindet unspezifisch und reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine und kann im Anschluss mit Wasser ausgewaschen werden. Zum Proteinachweis wurde die Nitrozellulosemembran für 2 Min in 1× Ponceau-S-Lösung gegeben und in der Folge durch Waschen mit 1× TBS-0,1 % Tween entfärbt.

3.2.2.6 Immunchemischer Nachweis der Proteine

Im Rahmen des immunchemischen Nachweises spezifischer Proteine erfolgt eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Zunächst wird mittels eines für das Zielantigen spezifischen Primäntikörpers das Zielprotein markiert. Anschließend wird ein enzymkonjugierter speziesspezifischer Sekundäntikörper eingesetzt, welcher die Fc (engl. *fragment, crystallizable*)-Region der Primäntikörper bindet. Die eigentliche Signaldetektion erfolgt somit über den Sekundäntikörper. Um unspezifische Proteinbindungen in der Folge zu minimieren, wurde die Nitrozellulosemembran zunächst 1 h bei RT in Blockierungspuffer auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit 300 µl des in 1× TBS-0,1 % Tween-1 % Magermilchpulver verdünnten Primäntikörpers über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert. Nachdem die Membran einem dreimaligen Waschschrift über jeweils 10 Min in 1× TBS-0,1 % Tween auf dem Schüttler unterzogen worden war, wurde sie mit 300 µl des

jeweiligen Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, Abk. HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers in 1× TBS-0,1 % Tween-1 % Magermilchpulver 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde daraufhin erneut dreimal für jeweils 10 Min in 1× TBS-0,1 % Tween gewaschen. Die Detektion der mit den Antikörpern gekoppelten Proteine erfolgte mit dem *Chemi Glow West Chemiluminescence Substrate Kit* von *Alpha Innotech* nach Herstellerangaben und unter Verwendung von Röntgenfilmen (*Hyperfilm™ ECL™*).

Tabelle 3.2.2.6-1: Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten für den Proteinnachweis auf Nitrozellulosemembranen

Primärantikörper	Verdünnung	Inkubation
Maus Anti-human β -Amyloid ₁₋₁₇ , 6E10, monoklonal	1 : 1 000	über Nacht 4 °C
Maus Anti- β -Aktin, monoklonal	1 : 10 000	über Nacht 4 °C
Kaninchen Anti-LC3 Antiserum N-terminales Peptid (LC3 ₁₋₁₅) MPSEKTFKQRRTFEQR	1 : 2 000	über Nacht 4 °C

Sekundärantikörper	Verdünnung	Inkubation
HRP-konjugiertes Ziege Anti- Maus IgG	1 :10 000	1 h RT
HRP-konjugiertes Ziege Anti- Maus IgG	1 :10 000	1 h RT
HRP-konjugiertes Ziege Anti- Kaninchen IgG	1 : 50 000	1 h RT

3.2.2.7 Entfernen der Antikörper von der Nitrozellulosemembran (Strippen) mit anschließender Re-Immundetektion

Um auf einer Nitrozellulosemembran weitere Antigene durch Bindung mit entsprechenden Primär- bzw. Sekundärantikörpern nachzuweisen, müssen zunächst die bereits gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran zunächst über 10 Min in 1× TBS-0,1 % Tween auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurden 1 : 10-Verdünnungen der Lösungen A und B des *Blot Restore Membran Rejuvenation Kits* der Firma *Chemicon* hergestellt. Die Membran wurde dann über 10 Min in 10 ml der Lösung A inkubiert. Dem folgte eine Inkubation der Membran in Lösung B über 15 Min. Die Membran wurde daraufhin für 1 h in 10 ml 1× TBS-4 % Magermilchpulver geblockt. Eine erneute Inkubation mit einem weiteren Primärantikörper konnte nun durchgeführt werden. Das Strippen der Membranen wurde regelmäßig durchgeführt, um auf den jeweiligen Membranen

neben dem eigentlichen Ziel-Antigen auch β -Aktin als Ladungskontrolle nachzuweisen (siehe *Tabelle 3.2.2.7-1*).

Tabelle 3.2.2.7-1: Immundetektion von β -Aktin nach Strippen der Nitrozellulosemembran

Reagenzien	Menge	Inkubationsdauer
1× TBS-0,1 % Tween	10 ml	10 min, RT
Lösung A 1 : 10 verdünnt mit 1× TBS-0,1 % Tween	10 ml	10 min, RT
Lösung B 1 : 10 verdünnt mit 1× TBS-0,1 % Tween	10 ml	15 min, RT
4 % Magermilch in 1× TBS-0,1 % Tween	10 ml	mind. 1 h, RT
Primärantikörper Maus Anti- β -Aktin 1:10 000 verdünnt mit 1× TBS- 0,1 % Tween-4 % Magermilchpulver	300 μ l	über Nacht, 4 °C
1× TBS-0,1 % Tween	10 ml	3x 10 min, RT
Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG 1 : 10 000 verdünnt mit 1× TBS- 0,1 % Tween-4 % Magermilchpulver	300 μ l	1 h, RT

3.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder FACS (engl. *fluorescence activated cell sorting*)-Technologie erlaubt es, einzelne Zellen im Hinblick auf ihre Größe und Granularität zu untersuchen. Hierbei können große Zellpopulationen in kürzester Zeit bezüglich mehrerer Merkmale parallel analysiert werden. Das Messprinzip basiert auf der Detektion von durch die Zelle emittiertem Licht einer bestimmten Wellenlänge nach Anregung durch einen Laser. Bezüglich des emittierten Lichts unterscheidet man zwischen Vorwärts- (engl. *forward scatter*, Abk. FSC) und Seitwärtsstreulicht (engl. *sidewarde scatter*, Abk. SSC). Während der FSC auf die Streuung des Lichts im flachen Winkel Bezug nimmt und somit von dem Volumen der Zelle abhängig ist, beschreibt der SSC die Granularität der Zelle über Detektion der Streuung des Lichts im rechten Winkel. Um bestimmte zelluläre Strukturen und Antigene einer Zellpopulation zu quantifizieren, können Zellen mit einem fluoreszenzgekoppelten

Antikörper oder Fluorochromen markiert werden. Aufgrund charakteristischer Absorptions- und Emissionsspektren führen die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe in der Folge zu einem spezifischen Signal und können je nach Kombination auch parallel zueinander detektiert werden. Die markierten Zellen werden hierbei entlang eines laminaren Probenstroms einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Die entsprechend emittierten Fluoreszenzsignale werden über verschiedene Kanäle des FACS-Gerätes detektiert und können somit analysiert und quantifiziert werden. Weiterhin können Zellpopulationen anhand definierter Parameter sortiert werden.

3.2.3.1 Quantifizierung der spezifischen DNA-Fragmentation

Apoptose ist eine Form des Zelltodes in eukaryotischen Zellen und spielt eine Rolle bei der Zellhomöostase, Gewebeintegrität, Tumorgenese und Immunantwort. Im Rahmen der Apoptose kommt es zu einer Reihe spezifischer biochemischer und morphologischer Veränderungen in der Zelle. In einem frühen Stadium der Apoptose findet eine Aktivierung von Caspasen statt. Caspasen gehören einer Proteinfamilie an, deren Mitglieder strukturelle Proteine des Zytoskeletts sowie nukleäre Proteine fragmentieren. Weiterhin werden DNAsen durch Caspasen aktiviert. Diese DNAsen fragmentieren in der Folge die DNA an den Verbindungsregionen zwischen Oligonukleosomen (ARENDS et al. 1990). Distinktive morphologische Veränderungen der Zelle und ausgeprägte DNA-Fragmentierung sind das Ergebnis dieser biochemischen Ereignisse während des programmierten Zelltodes. Der Anteil der degradierten DNA einer Zelle verlässt den Zellkern und weist ein geringeres Molekulargewicht als die nicht-degradierte DNA auf, welche im Nukleus verbleibt. Fragmentierte DNA außerhalb des Zellkerns und nukleäre DNA können über Färbungen mit Fluorochromen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden (NUNEZ 2001). Die DNA-interkalierende Substanz TO-PRO[®]-3 gehört zu einer Gruppe von monomerischen Zellkern-Farbstoffen und erlaubt aufgrund der hohen Intensität des Fluoreszenzsignals eine sehr sensitive DNA-Detektion. Apoptotische Zellen, welche mit TO-PRO[®]-3 gefärbt und mittels Durchflusszytometer analysiert werden, zeigen einen breiten hypodiploiden Gipfel im Vergleich mit nicht-apoptotischen Zellen, die sich als enger diploider Gipfel im roten Fluoreszenzkanal darstellen (RICCARDI und NICOLETTI 2006). Die Rate an apoptotischem Zelltod in Zellen der CCL136-Zelllinie wurde nach 24 h durch die Quantifizierung der TO-PRO[®]-3-Permeabilität und der spezifischen DNA-Fragmentation in hypodiploiden Zellen in der Durchflusszytometrie gemessen. Alle Experimente wurden in 6-Well-Platten durchgeführt und bei einer Konfluenz von 60 bis 70 % begonnen. Zum Zeitpunkt der jeweiligen Messung betrug die Konfluenz 90 bis 100 %. Hierzu wurden zunächst die Überstände der in 6-Well-Platten gewachsenen Myoblasten in FACS-Röhrchen überführt. Daraufhin wurden die adhärennten Zellen mit jeweils 1 ml 0,05 % Trypsin-EDTA pro Well abgelöst. Die

Zellsuspensionen wurden anschließend in die entsprechenden FACS-Röhrchen transferiert. Alle Röhrchen wurden nun bei 200 g über 5 Min bei RT abzentrifugiert. Die Überstände wurden abpipettiert und die verbliebenen Zellpellets in 1 ml 1× PBS resuspendiert. Die Röhrchen wurden erneut bei 200 g über 5 Min bei RT abzentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände wurden die Zellpellets nun in 500 µl 1× PBS resuspendiert. Um die Zellen zu fixieren, wurden zu allen Röhrchen 4,5 ml gekühltes 70 %iges Ethanol gegeben. Die FACS-Röhrchen wurden bei 400 g über 5 Min bei RT abzentrifugiert, der Überstand entfernt und die fixierten Zellen mit 5 ml 1× PBS resuspendiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt, die Zellen allerdings anschließend in nur 500 µl 1× PBS aufgenommen. Pro Röhrchen wurden 500 µl DNA-Extraktionspuffer dazugegeben. Die Röhrchen wurden daraufhin zunächst bei RT 5 Min inkubiert und anschließend erneut bei 400 g über 5 Min abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und in jedes Röhrchen 10 µl TO-PRO[®]-3 (10 µM) sowie 2 µl RNase A pipettiert. Alle Röhrchen wurden bis zu einem Endvolumen von 1 ml mit 1× PBS aufgefüllt. Die Proben wurden schließlich lichtdicht verschlossen und über 1 h bei RT inkubiert. Anschließend konnte die Messung der Proben mittels Durchflusszytometer vorgenommen werden. Mindestens 20000 Zellen wurden pro Probe analysiert. Die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung eines 488 nm-Lasers zur Exzitation. Hypodiploide DNA-Gipfel wurden über rote Fluoreszenz (> 600 nm) und SSC gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels *FlowJo-Software*.

3.2.3.2 Durchflusszytometrische Analyse der MHC-Klasse-I- und -II-Expression

Alle Experimente wurden in 24-Well-Platten durchgeführt und bei einer Konfluenz von 60 bis 70 % begonnen. Zum Zeitpunkt der jeweiligen Messung betrug die Konfluenz 90 bis 100 %. Zunächst wurden die Überstände der jeweiligen Wells abgenommen, die Zellen vorsichtig einmal mit warmem 1× PBS gewaschen und 1 Min bei 37 °C in 200 µl 0,05 % Trypsin-EDTA inkubiert. Die Reaktion wurde mit 500 µl kaltem DMEM-Medium terminiert, die Zellen abgelöst und in entsprechende FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 300 g über 5 Min bei RT abzentrifugiert und einmal in 1× PBS gewaschen. Im Folgenden wurden die Zellen entweder in 0,5 % Saponin über 10 Min bei RT permeabilisiert oder aber nichtpermeabilisiert belassen. Im Anschluss erfolgte die Färbung der Zellen mit den direkt fluorochrommarkierten Antikörpern (PE-konjugiertes Anti-Human HLA-DR-IgG bzw. FITC-konjugiertes Anti-Human HLA-A, -B, -C-IgG) über 30 Min bei 4 °C im Dunkeln. Es folgte ein weiterer Waschschrift in 1× PBS, das Abzentrifugieren bei 300 g über 5 min bei RT und die Resuspendierung in 200 µl FACS-Puffer. Anschließend konnte die Messung der Proben mittels Durchflusszytometer vorgenommen werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels *FlowJo-Software*.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Spezifischer knock down durch Transfektion von small interfering RNA in humanen Myoblasten

Die Verringerung des ATG12-Genproduktes wurde mittels RNA-Interferenz (Abk. RNAi) erreicht, indem eine für ATG12-spezifische *small interfering RNA* (Abk. siRNA) in humane Myoblasten transfiziert wurde. Transfektion beschreibt das Einbringen genetischen Materials in eukaryotische Zellen. RNA-Interferenz ist ein posttranskriptioneller *gene silencing*-Mechanismus, im Rahmen dessen exogen zugeführte doppelsträngige RNA zur spezifischen Degradation homologer mRNA-Moleküle führt. Das entsprechende Genprodukt wird in der Folge nicht mehr bzw. nur noch in stark reduzierter Menge gebildet. Für den *knock down* wurde eine validierte ATG12-siRNA verwendet. Um die Effekte der Transfektion mit einer spezifischen siRNA auf Zellen zu untersuchen, wurde bei jeder Transfektion separat mit einer standardisierten Kontroll-siRNA transfiziert. Die Transfektion wurde mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Nanofektin durchgeführt. Nanofektin zeichnet sich durch eine hohe Transfektionseffizienz bei geringer Zytotoxizität aus. Hierbei bindet die negativ geladene siRNA an ein positiv geladenes Polymer, welches in einen porösen Nanopartikel eingelagert ist. Der daraus entstandene positiv geladene Komplex kann die mRNA sehr effizient binden. Ferner wird durch die Oberflächenvergrößerung die Bindungskapazität um ein Vielfaches erhöht. Die Zelle nimmt diesen Nanopartikel zusammen mit der siRNA über Endozytose auf. Innerhalb der Zelle schützen diese Nanopartikel die zu transfizierende siRNA vor endonukleolytischer Degradation durch Endonukleasen und erhöhen somit die Effizienz des erwünschten Gen-*knock downs*. Transfektionen wurden in Zellen durchgeführt, welche zu 50 % konfluent in 24-Well-Platten (für Immunoblot-Analysen) oder 8-Kammer-Objektträgern (für Immunzytochemie) gewachsen waren. Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden initial $0,5 \times 10^4$ Zellen pro Kammer ausplattiert.

Der Inhalt der kommerziell erworbenen ATG12-siRNA (5 nmol/Tube bzw. 74 µg/Tube), wurde in 250 µl des vom Hersteller mitgelieferten siRNA-Suspensionspuffers rekonstituiert. Es lag nun eine siRNA-Stockkonzentration von 0,296 µg/µl vor. Die siRNA wurde mit dem Transfektionsreagenz Nanofektin in einem Verhältnis von 1 : 2 eingesetzt. Als Kontrolle kam eine *Silencer® Negative Control siRNA* zum Einsatz. Zunächst wurden zwei Lösungen angesetzt. Bei Verwendung einer 24-Well-Platte galt pro Well:

Tabelle 3.3.1-1: Verhältnis zwischen ATG12-siRNA und Nanofektin beim Einsatz in 24-Well-Platten

Lösung A	Lösung B
ATG12-siRNA	Nanofectin
3 µl des Stocks	6 µl
+ 30 µl PBS	+ 30 µl PBS

Lösung B wurde zu Lösung A gegeben und einmal vorsichtig auf- und abpipettiert. Das Lösungsgemisch wurde dann bei RT für 20 Min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung (69 µl pro Well) auf die Zellen pipettiert. Nach 7 h Inkubationszeit wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um die Zytotoxizität durch das Transfektionsreagenz weitestgehend zu verhindern. Nach 48 h wurde die *knock-down*-Effizienz im Immunoblot, der RT-PCR oder in der Fluoreszenzmikroskopie detektiert.

3.3.2 mRNA-Analyse mittels quantitativer reverse-Transkription-PCR

Die RT-PCR ist eine Methode zur Detektion und Quantifizierung von Expressionsmustern auf Ebene der mRNA. Im Vergleich zu anderen Methoden, welche der mRNA-Detektion dienen, wie beispielsweise dem Northern Blot, ist die RT-PCR äußerst sensitiv und erlaubt die Quantifizierung selbst kleinster RNA-Mengen. Um eine quantitative Analyse von mRNA mittels RT-PCR zu ermöglichen, wird in der Regel die Echtzeit-PCR (engl. *Real Time-PCR*) durchgeführt. Auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruhend ermöglicht die *Real Time-PCR* eine Quantifizierung von mRNA mittels Einlagerung eines fluoreszierenden Farbstoffs in die DNA.

3.3.2.1 RNA-Aufreinigung

Das *RNeasy Mini Kit* der Firma *Quiagen* wurde zur Isolation von RNA aus Myoblasten verwendet. Die für sämtliche Experimente eingesetzten Zellen wuchsen vorher in 24-Well-Platten. Nach Abnahme des Mediums aus den Wells wurden die Zellen in 250 µl 1× PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen durch Hinzufügen von 350 µl des im Kit enthaltenen RLT-Puffers über 30 Min. Die Homogenisierung der Zellsuspension erfolgte durch zehnmalsiges Auf- und Abpipettieren. Nachdem die Suspension anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt worden war, wurden 350 µl 70 %iges RNase-freies Ethanol zugegeben und über 3 Min bei 13400 g zentrifugiert. Die Überstände wurden auf Mikrosäulen des *RNeasy Mini Kits* pipettiert. Damit die RNA selektiv an die Silikagel-Membran der Mikrosäulen binden konnte, wurden diese nun bei 10000 g über 30 Sek zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Mikrosäulen auf ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Es schlossen sich Waschschrte mit 700 µl RWI-Puffer sowie zwei Durchgänge mit 500 µl RPE-Puffer an. Den Waschschrten folgte jeweils eine Zentrifugation

bei 10000 g, wobei die ersten beiden Zentrifugationsschritte 30 Sek betragen und der dritte über 2 Min erfolgte, um ein Trocknen der Membran zu beschleunigen. Durch Zugabe von 33 µl RNase-freiem Wasser auf die Membran und anschließende Zentrifugation über 1 Min bei 10000 g konnte die an der Membran adsorbierte RNA eluiert werden. Nachfolgend wurde die RNA entweder direkt weiterverarbeitet oder bei –80 °C gelagert.

3.3.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Mit Hilfe eines *Nanodrop* Spektralphotometers konnte die Konzentration der isolierten RNA entsprechend den Herstellerangaben bestimmt werden. Da das Absorptionsmaximum der Pyrimidin- und Purinringe der RNA-Basen bei 260 nm liegt, wurden die RNA-Konzentrationen bei dieser Wellenlänge durch Extinktionsmessung ermittelt. Das Spektralphotometer erlaubt eine Quantifizierung bereits kleinster Mengen von Nucleinsäuren, so dass nur 1 µl der jeweiligen Probe zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt werden musste. Als Referenzwert wurde 1 µl RNase-freies Wasser verwendet.

3.3.2.3 cDNA-Synthese/reverse Transkription

Während der reversen Transkription wird eine zu der jeweiligen mRNA komplementäre cDNA (engl. *complementary DNA*) unter Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase erstellt. Hierbei entsteht ein RNA-DNA-Doppelstrang. Als Primer für die RNA-abhängige DNA-Polymerase wurde ein zum Poly-A-Schwanz der mRNA komplementäres Oligo-dT-Nukleotid verwendet. Der RNA-Teil des RNA-DNA-Hybridstranges wurde durch die Endonukleaseaktivität (RNase H) der Reversen Transkriptase entfernt. Der isolierte DNA-Strang konnte nun als Kopie für weitere Replikationen genutzt werden. Zur Synthese der zur mRNA komplementären cDNA wurde das *Super Script™ II-Kit* entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Ein Reaktionsansatz setzte sich aus den in *Tabelle 3.3.2.3-1* aufgeführten Komponenten zusammen.

Tabelle 3.3.2.3-1: Erster Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Reagenz	Menge [µl]
RNA (200 ng)	x (x = 200 / c)
Oligo-dT	1
dNTP Mix (10 mM)	1
H ₂ O	y ad 12 (y = 10 - x)

Der in *Tabelle 3.3.2.3-1* beschriebene Ansatz wurde zur Auftrennung der RNA-Sekundärstrukturen und Anlagerung des Primers bei 65 °C für 4 Min in einem Thermo-Cycler

inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis mit den in *Tabelle 3.3.2.3-2* aufgeführten Komponenten versetzt.

Tabelle 3.3.2.3-2: Zweiter Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Reagenz	Menge [μ l]
5× first strand Puffer	4
DTT (0,1 M)	2
H ₂ O	1,5
Super Script	0,5

Die reverse Transkription erfolgte bei einer Temperatur von 42 °C über 50 Min. Durch Erhöhung der Temperatur auf 70 °C über 15 Min wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert. Nachdem die erstellte doppelsträngige cDNA auf 4 °C abgekühlt war, wurde sie bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

3.3.2.4 Quantitative Real Time-PCR

Die Analyse des Expressionsgrades des Zielgens erfolgte mittels Real Time-PCR. Diese beruht grundsätzlich auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, erlaubt aber über Detektion eines Fluoreszenzsignals die Quantifizierung der jeweiligen Nukleinsäure in Echtzeit. Das Fluoreszenzsignal nimmt hierbei proportional zu der Menge der gebildeten PCR-Produkte zu und kann in der exponentiellen Phase der PCR quantifiziert werden.

Die Quantifizierung erfolgte über ein *TaqMan*[®]-Sonden-System. Dies ermöglichte, während der PCR gezielt nur das gewünschte Zielgen-Produkt nachzuweisen. Die Sonden bestehen grundsätzlich aus einer kurzen Nukleinsäureabfolge, die an einem Ende mit einem Reporterfarbstoff, am anderen Ende mit einem Quencher markiert sind. Quencher sind Moleküle, welche die Fluoreszenz von Farbstoffen in ihrer Nähe abfangen. Während der Hybridisierungsphase befinden sich die Quencher in räumlicher Nähe zu den Reportern, wodurch das Fluoreszenzsignal ausgelöscht wird. Durch ihre 5´-3´-Endonuklease-Aktivität sind die verwendeten Polymerasen des PCR-Ansatzes während der Elongationsphase in der Lage, die *TaqMan*[®]-Sonden bei der Vervielfältigung der Nukleinsäurematrize zu hydrolysieren. Hierbei setzen sie zunächst den Reporterfarbstoff frei, welcher somit aus dem Einflussbereich des Quenchers gelangt. Das Fluoreszenzsignal nimmt entsprechend der Amplifikationsmenge zu und die vom Reporter emittierte Fluoreszenz wird somit nur dann am Ende der Elongationsphase jedes Zykluses messbar, wenn die Polymerase tatsächlich den gewünschten Zielbereich kopiert hat. Jedes freigesetzte Molekül Reporterfarbstoff steht daher für einen gebildeten DNA-Strang.

Die hier eingesetzten Sonden waren am 5´-Ende mit dem Reporterfarbstoff FAM (6-carboxy-fluorescein) und am 3´-Ende mit einem Quencher markiert. Die Detektion des

Fluoreszenzsignals erfolgte nach jedem Zyklus mit dem *ABI-Prism-7500-Cycler*, wofür ein 96-Well-PCR-Mikrotiterplatten-System verwendet wird.

Die in *Tabelle 3.3.2.4-1* aufgeführten Reagenzien waren Bestandteil des Hauptmixes zur Quantifizierung von ATG12 und GAPDH.

Tabelle 3.3.2.4-1: Hauptmix der quantitativen Real Time-PCR

Reagenz	Menge [µl]
PCR 2× Mix	10
H ₂ O	8,5
Rox	0,05 auf 25 µl

Der PCR 2× Mix enthielt die Taq-DNA-Polymerase, Magnesiumchlorid, DNA-Glykosylasen sowie dNTPs. Der quantifizierbare Farbstoff Carboxy-X-Rhodamin (Abk. Rox) wurde hinzugegeben, um pipettierbedingte Volumenunterschiede der PCR-Proben durch Normalisierung auf die Rox-Menge zu vermeiden. Zu dem in *Tabelle 3.3.2.4-1* beschriebenen Hauptmix wurden 0,5 µl der jeweiligen cDNA gegeben. Für jedes Zielgen wurden pro Well 1 µl der entsprechenden Primer-Proben sowie 19 µl des Mixes mit cDNA in eine 96-Well-PCR-Microtiterplatte pipettiert. Die Quantifizierung erfolgte jeweils in Triplikaten. Die RT-PCR lief entsprechend der in *Tabelle 3.3.2.4-2* aufgeführten Einstellung.

Tabelle 3.3.2.4-2: Konditionen der Real Time-PCR

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

Tabelle 3.3.2.4-3: Verwendete Primer-Proben

Assay ID	Gensymbol	Genname
Hs99999905_m1	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Hs00740818_m1	ATG12	Autophagy-related gene 12

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

4. Ergebnisse

4.1 Makroautophagie ist ein konstitutiv aktiver Prozess in humanen

Skelettmuskelzellen

Der spezifische Autophagosomenmarker LC3 wurde verwendet, um Makroautophagie in Skelettmuskelzellen zu quantifizieren. Um den lysosomalen Umsatz von LC3 sichtbar zu machen, wurde eine humane Myoblasten-Zelllinie (CCL136) aus immortalisierten Rhabdomyosarkomzellen verwendet, welche mit einem lentiviralen GFP-LC3-Fusionskonstrukt stabil transfiziert worden war (SCHMID et al. 2007). Die GFP-LC3-transfizierten Zellen wurden mit dem lysosomalen Azidifikationsinhibitor Chloroquin (Abk. CQ) inkubiert. Somit wurde die lysosomale Proteolyse blockiert und die Akkumulation von GFP-LC3 in Autophagolysosomen sichtbar gemacht. Um zu zeigen, dass die Myoblasten-Zelllinie CCL136 konstitutive Aktivität von Makroautophagie aufweist, wurden die GFP-LC3⁺-Zellen zunächst unter dem Konfokalmikroskop untersucht.

Im Fließgleichgewicht (ohne CQ-Behandlung) wiesen die meisten Myoblasten nur wenige GFP-LC3⁺-Autophagosomen auf und nur eine kleine Fraktion der Zellen zeigte GFP-LC3⁺-Vesikel. Allerdings zeigte sich nach einer zehnstündigen Exposition der Zellen gegenüber CQ eine deutliche Akkumulation der GFP-LC3⁺-Vesikel. Dies legt die zahlreiche Bildung von GFP-LC3-markierten Autophagosomen nahe, welche in der Folge mit Lysosomen fusionierten. Um zu untersuchen, ob die Inkubation mit CQ auch in primären humanen Myoblasten zu einer Akkumulation von LC3⁺-Vesikeln führt, wurden diese nach zehnstündiger Inkubation mit einem für LC3 spezifischen monoklonalen Maus Anti-human Antikörper gefärbt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem Azidifikationsinhibitor CQ zu einer Akkumulation von LC3⁺-Vesikeln im Zytosol der Myoblasten führte.

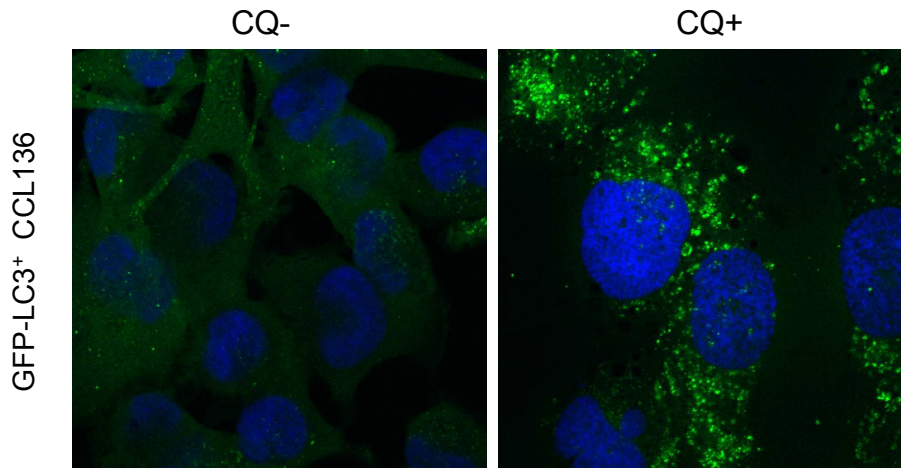


Abbildung 4.1-1 (modifiziert nach KELLER et al. 2011): Analyse von LC3⁺-Vesikeln in An- und Abwesenheit von CQ mittels Konfokalmikroskopie. Es kam zu einer deutlichen Zunahme der GFP-LC3⁺-Vesikel nach zehnstündiger Inkubation mit dem lysosomalen Azidifikationsinhibitor CQ (50 μ M) in Myoblasten der mit GFP-LC3 transfizierten Zelllinie CCL136. Die Zellkerne wurden durch eine DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Die Aufnahmen wurden mittels Konfokalmikroskopie angefertigt.

In einem nächsten Schritt wurde ermittelt, ob die Inhibition von Makroautophagie mittels spezifischer ATG12-siRNA zu einer geringeren Akkumulation von GFP-LC3⁺-Vesikeln führt. Bei dem Genprodukt von ATG12 handelt es sich um ein für die Formation von Autophagosomen essentielles Protein (YORIMITSU und KLIONSKY 2005). Sowohl in der Immunzytochemie als auch im Immunoblot konnte gezeigt werden, dass unter Inhibition von Makroautophagie die Formation von LC3⁺-Vesikeln reversibel war. In der Real Time-PCR konnte die *knock-down*-Effizienz auf mRNA-Ebene ermittelt werden. Im Rahmen des Immunoblots wurde zwischen dem Autophagosomen-assoziierten LC3 (Abk. LC3-II) und dem freien zytosolischen LC3 (Abk. LC3-I) aufgrund ihres unterschiedlichen molekularen Gewichts in der Gelelektrophorese unterschieden.

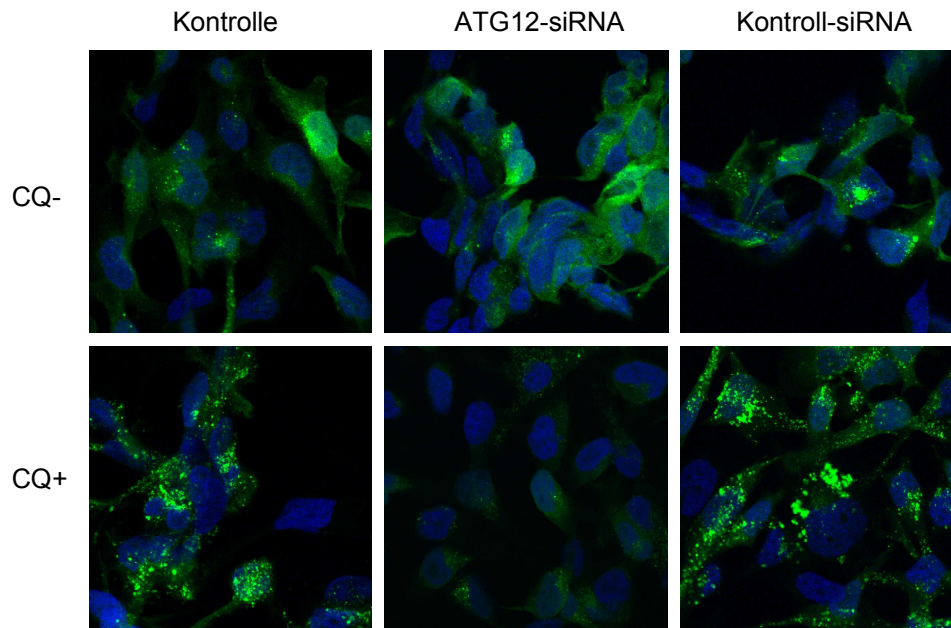
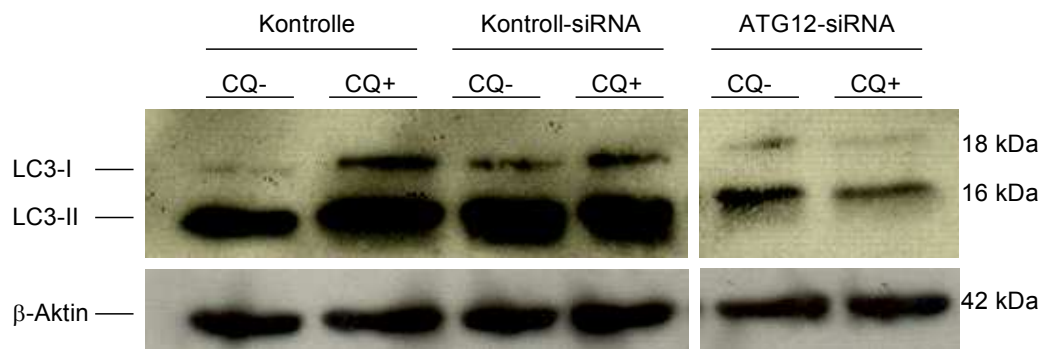
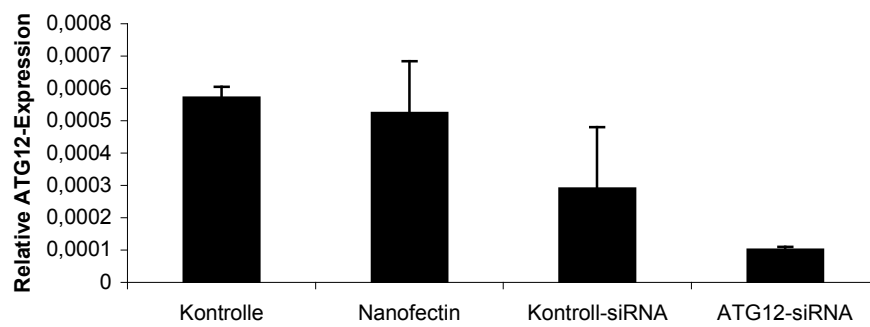
A**B****C**

Abbildung 4.1-2 (modifiziert nach KELLER et al. 2011): Inhibition von Makroautophagie mittels ATG12-spezifischer siRNA. A: Die Akkumulation der GFP-LC3⁺-Vesikel unter CQ-Behandlung war abhängig von makroautophagischer Aktivität, da sich unter Zuhilfenahme einer ATG12-spezifischen siRNA und der konsekutiven Verringerung der Expression dieses Gens weniger GFP-LC3⁺-Vesikel bildeten. Als Kontroll-siRNA wurde eine siRNA ohne Zielgen verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hilfe einer DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Die Aufnahmen wurden mittels Konfokalmikroskopie angefertigt. B: Immunoblot zur Proteindetektion von LC3-II in Kontrollen und nach *knock down* von ATG12. Als Ladungskontrolle wurde der Nachweis von β -Aktin verwendet. Die Proteinaufreinigung fand 72 h nach ATG12-*knock-down* statt. Sowohl die in der Konfokalmikroskopie aquirierten Daten (A) als auch der Immunoblot (B) zeigen eine deutliche Verringerung der LC3- (B) bzw. GFP-LC3- (A) Expression unter ATG12-*knock-down* gegenüber Kontrollen. C: Expression der ATG12-mRNA nach Transfektion mit ATG12-spezifischer siRNA. Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten eines Experimentes. Die Expression wurde relativ zu dem Haushaltsgen GAPDH gemessen.

4.2 Hochregulation von Makroautophagie durch Rapamycin in Skelettmuskelzellen

Wenngleich Makroautophagie in Säugetierzellen auf der Ebene des Basalmetabolismus stattfindet, kann diese im Sinne einer Hoch- bzw. Runterregulation über zahlreiche Wege chemisch moduliert werden (RUBINSZTEIN et al. 2007). Ein bereits beschriebener Mechanismus zur Hochregulation von Makroautophagie ist die durch Rapamycin (Abk. RAP) vermittelte Inhibition von mTOR (KAMADA et al. 2000). Um für die im Folgenden beschriebenen Experimente eine suffiziente Positivkontrolle für Makroautophagie im Skelettmuskel zur Verfügung zu haben, wurde zunächst gezeigt, dass Rapamycin auch in Myoblasten zu einer Hochregulation von Makroautophagie führt.

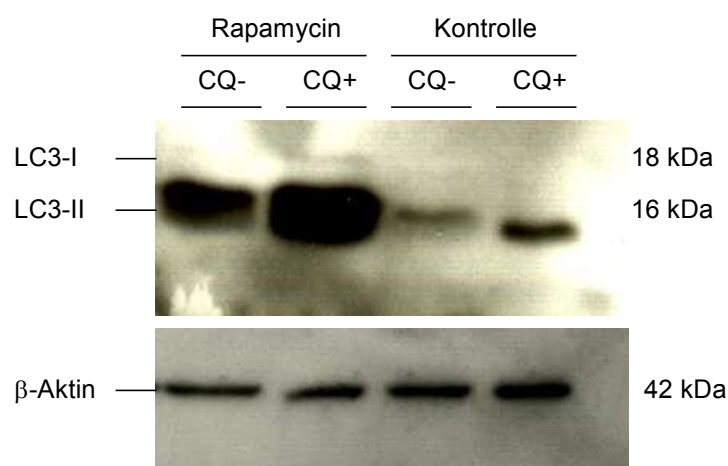


Abbildung 4.2-1: Hochregulation von Makroautophagie in Myoblasten durch Inhibition von mTOR mittels Rapamycin. Im Immunoblot konnte gezeigt werden, dass eine 48-stündige Inkubation von Myoblasten der Zelllinie CCL136 mit RAP (1 μ g/ml) in An- bzw. Abwesenheit von CQ (50 μ M, 10 h) zu einer deutlichen Zunahme der LC3-II-Expression gegenüber der Kontrolle führte. Als Ladungskontrolle wurde der Nachweis von β -Aktin verwendet.

Mit den in *Punkt 4.1* und *Punkt 4.2* beschriebenen Experimenten wurde gezeigt, dass Makroautophagie in Myoblasten sowohl ein konstitutiv aktiver Prozess ist als auch über die Inhibition von mTOR positiv regulativ oder unter Zuhilfenahme von ATG12-spezifischer siRNA negativ regulativ beeinflusst werden kann. Rapamycin konnte somit im Rahmen der folgenden Experimente als Positivkontrolle verwendet werden.

4.3 Zytokin-vermittelte Regulation von Makroautophagie in Myoblasten

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass sich in Muskelbiopsien von Patienten mit sIBM vermehrt LC3⁺-Autophagosomen fanden, welche mit einer Hochregulation von MHC-Klasse-I- und -Klasse-II-Molekülen sowie einer T-Zell-Infiltration assoziiert waren (LÜNEMANN et al. 2007). Ferner wurde bereits beschrieben, dass proinflammatorische Zytokine, welche im entzündeten Muskel überexprimiert werden, regulativ auf makroautophagische Prozesse und das Zellüberleben in verschiedenen Säugetierzelltypen wirken (DJAVAHERI-MERGNY et al. 2006, HARRIS et al. 2007). T-Zellen und myeloide dendritische Zellen stellen die Hauptzellpopulation in inflammatorischen Infiltraten der meisten immun-medierten Skelettmuskelerkrankungen dar (GREENBERG et al. 2007).

Im Folgenden wurde analysiert, ob Myoblasten suszeptibel gegenüber Zytokin-vermittelter Regulation von Makroautophagie sind. Hierzu wurden Myoblasten der Zelllinie CCL136 24 h mit Überständen, die aus der Kultur Phytohämagglutinin-aktivierter polyklonaler T-Zellen gewonnen wurden, inkubiert. Desweiteren wurden Myoblasten mit Überständen aus der Kultur Monozyten-abgeleiteter maturierter dendritischer Zellen (Abk. DCs) inkubiert.

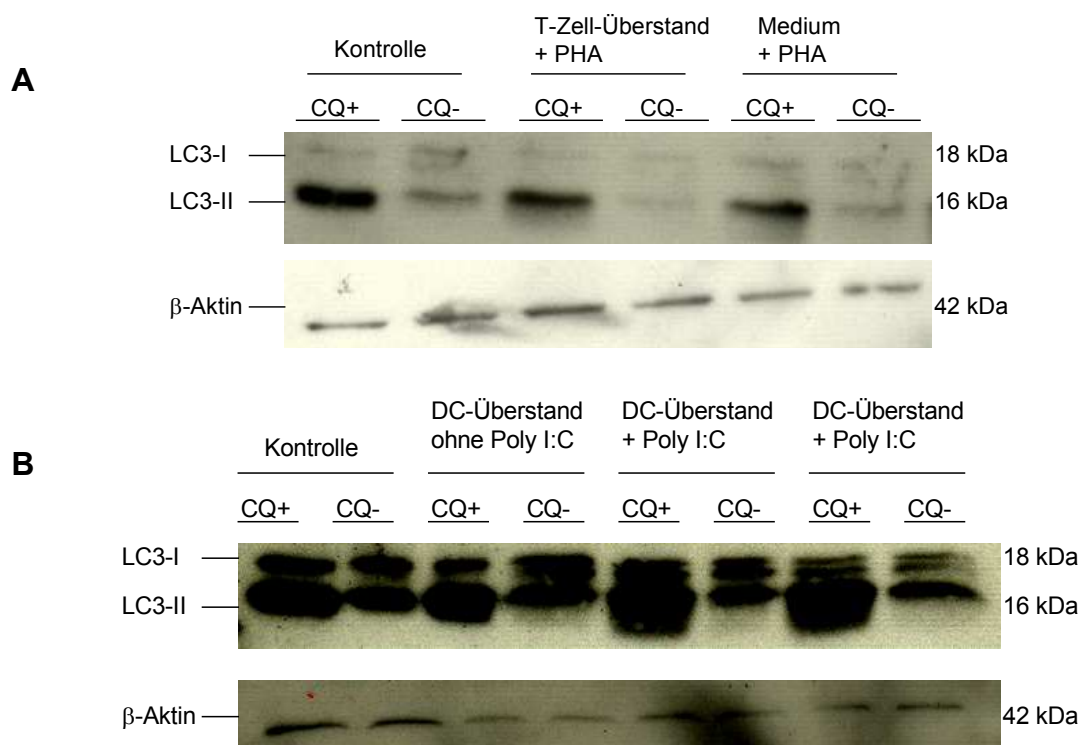


Abbildung 4.3-1 (modifiziert nach KELLER et al. 2011): Analyse autophagosomaler Aktivität in CCL136-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Überständen aus aktivierten T-Zell-Kulturen bzw. aus Kulturen Monozyten-abgeleiteter maturierter DCs in An- und Abwesenheit von CQ (50 µM, 10 h). CD3⁺ T-Zellen und CD14⁺ DCs wurden zunächst mittels MACS-Technik aus Leukozytenkonzentraten (engl. *buffy coats*) isoliert. Die T-Zellen wurden in der Anwesenheit von Polyhämagglutinin (Abk. PHA, 1 µg/ml) für 48 h kultiviert. Die DCs wurden durch Inkubation mit dem Toll-like Rezeptor (Abk. TLR)3-Agonisten Poly I:C (25 µg/ml) maturiert. Poly I:C ist eine doppelsträngige RNA, die aus Polyinosin- und Polycytidylsäuren besteht, eine Interferon-induzierende sowie immunpotenzierende Aktivität besitzt und regelmäßig für die Maturierung von DCs verwendet wird. A: Die 24-stündige Inkubation der Myoblasten mit T-Zell-Überständen führte im Immunoblot zu keiner Hochregulation der LC3-II-Expression gegenüber den Kontrollen und somit zu keiner Modulation von Makroautophagie. B: Hingegen kam es nach 24-stündiger Inkubation der Myoblasten mit Überständen aus der Kultur maturierter Monozyten-abgeleiteter DCs im Immunoblot zu einer Hochregulation der LC3-II-Expression. Die Überstände, die aus der Kultur nicht-maturierter DCs gewonnen wurden, führten gegenüber der Kontrolle ohne Behandlung zu keiner Hochregulation der LC3-II-Expression. Als Ladungskontrolle wurde der Nachweis von β-Aktin verwendet.

4.3.1 Inflammatorische Moleküle in Überständen Monozyten-abgeleiteter DCs

In einem nächsten Schritt wurden die Überstände aus den Kulturen maturierter DCs sowie aktivierter T-Zellen mittels Luminex-Technologie analysiert. Hierzu wurden Zellen aus Leukozytenkonzentraten von vier gesunden Blutspendern verwendet. Es konnten insgesamt zwanzig lösliche inflammatorische Moleküle in den Überständen beider Gruppen detektiert werden (KELLER et al. 2011). Folgende Moleküle wurden in höherer Konzentration in den Überständen der DCs detektiert als in den T-Zell-Überständen:

Tabelle 4.3.1-1 (modifiziert nach KELLER et al. 2011): Quantifizierung inflammatorischer Moleküle in Überständen aus der Kultur Monozyten- abgeleiteter maturierter dendritischer Zellen

Molekül	Konzentration (pg/ml)
IP-10	5070,61
MCP-1	1011,99
IL-8	1270,07
IL-12	1003,69
IL-1β	31,55
IL-4	2762,56
GM-CSF	3063,66
TNF-α	828,06

4.3.2 TNF-α moduliert die LC3-Expression in Myoblasten

Alle in *Tabelle 4.3.1-1* genannten Moleküle sowie IFN-γ (0,1 und 1 ng/ml) als klassisches, von zytotoxischen T-Zellen produziertes proinflammatorisches Molekül wurden nun im Folgenden sukzessive auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Makroautophagie in Myoblasten zu modulieren. Hierzu wurden Myoblasten jeweils mindestens dreimal mit den betreffenden

Substanzen in der im Luminex-Assay detektierten Konzentration sowie einer Konzentration, welche einen Logarithmus darüber lag, für jeweils 24 h inkubiert. Danach wurde mittels LC3-Immunoblot analysiert, ob die jeweilige Behandlung zu einer Modulation von Makroautophagie in den Myoblasten führte.

Unter allen zehn getesteten Molekülen führte nur die Inkubation von Myoblasten mit dem Zytokin TNF- α zu einer konsistenten Modulation von Makroautophagie im Sinne einer Hochregulation der Expression von LC3.

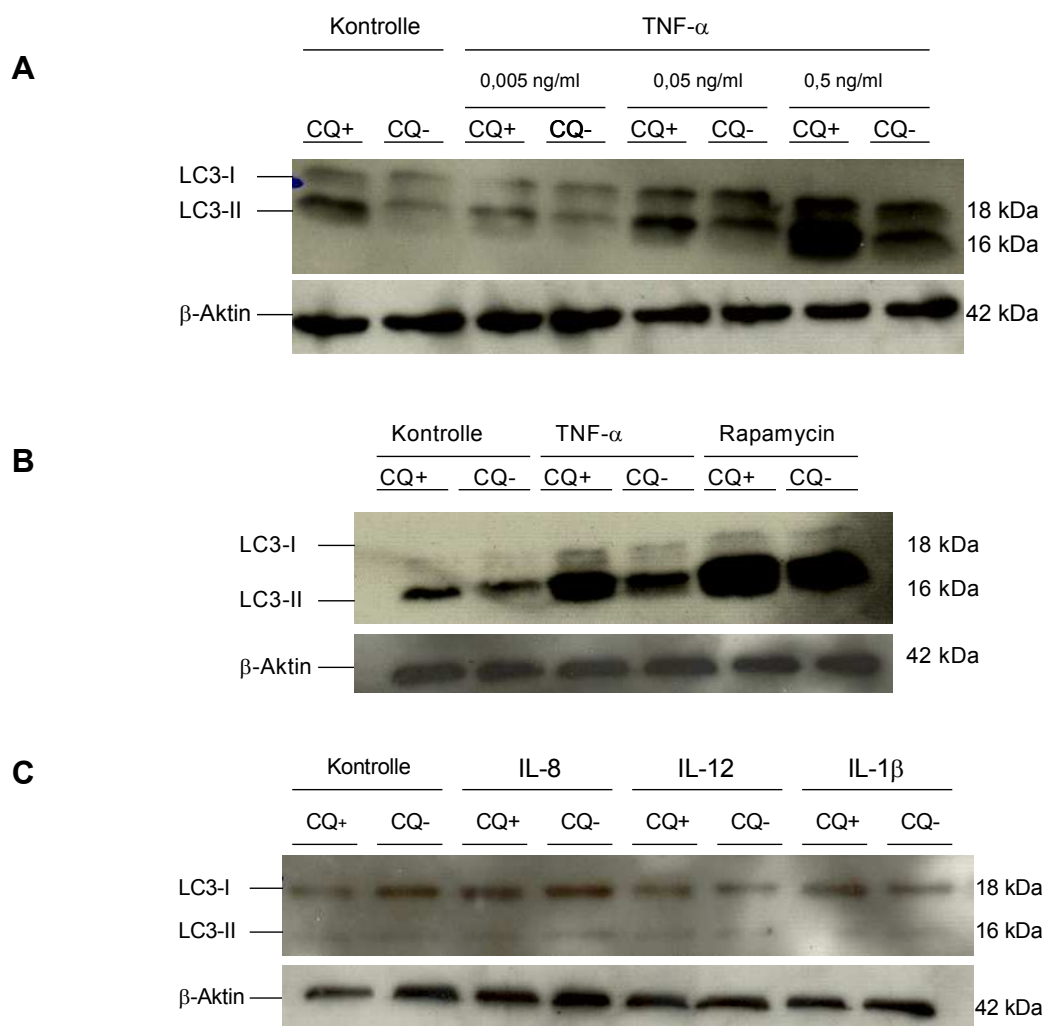


Abbildung 4.3.2-1 (modifiziert nach KELLER et al. 2011): Immunoblot-Detektion der LC3-II-Expression in Myoblasten nach 24-stündiger Exposition gegenüber inflammatorischer Moleküle in Konzentrationen gemäß vorheriger Luminex-Analyse. A: Unter allen getesteten Molekülen führte nur TNF- α zu einer konsistenten Hochregulation der LC3-II-Expression im Immunoblot. Die LC3-II-Expression wurde in An- und Abwesenheit von CQ (50 μ M, 10 h) untersucht. TNF- α führte bereits in Konzentrationen von 50 pg/ml zu einer sichtbaren Hochregulation der LC3-II-Expression gegenüber der Kontrolle. B: TNF- α zeigt im direkten Vergleich mit dem etablierten Makroautophagie-Induktor Rapamycin einen ähnlichen Effekt bezüglich der Hochregulation der LC3-II-Expression. C: Stellvertretend für die verbliebenen neun inflammatorischen Moleküle, welche getestet wurden, zeigen IL-8 (10 ng/ml), IL-12 (5 ng/ml) und IL-1 β (1 ng/ml) keine Modulation der LC3-II-Expression im Immunoblot. Als Ladungskontrolle wurde der Nachweis von β -Aktin verwendet.

In einem nächsten Schritt wurden Zellen der CCL136-Zelllinie, welche vorher mit einem stabilen GFP-LC3-Fusionskonstrukt transfiziert worden waren, mit $\text{TNF-}\alpha$ inkubiert, um eine Modulation des GFP-LC3-Signals in der Konfokalmikroskopie zu detektieren. Auch hier konnte eine Zunahme der LC3-Expression nach Exposition der Myoblasten gegenüber $\text{TNF-}\alpha$ beobachtet werden, die vergleichbar war mit einer Hochregulation der LC3-Expression infolge einer Inkubation mit Rapamycin. Um zu untersuchen, ob es auch in primären humanen Myoblasten zu einer $\text{TNF-}\alpha$ -medierten Hochregulation der LC3-Expression kommt, wurden diese Zellen im Folgenden in An- und Abwesenheit von Chloroquin über 24 h mit $\text{TNF-}\alpha$ inkubiert und danach mit dem in *Punkt 4.1* bereits beschriebenen, für LC3-spezifischen monoklonalen Maus Anti-human Antikörper, gefärbt. Auch hier kam es unter der Exposition der primären Myoblasten gegenüber $\text{TNF-}\alpha$ zu einer deutlichen Zunahme der LC3^+ -Vesikel.

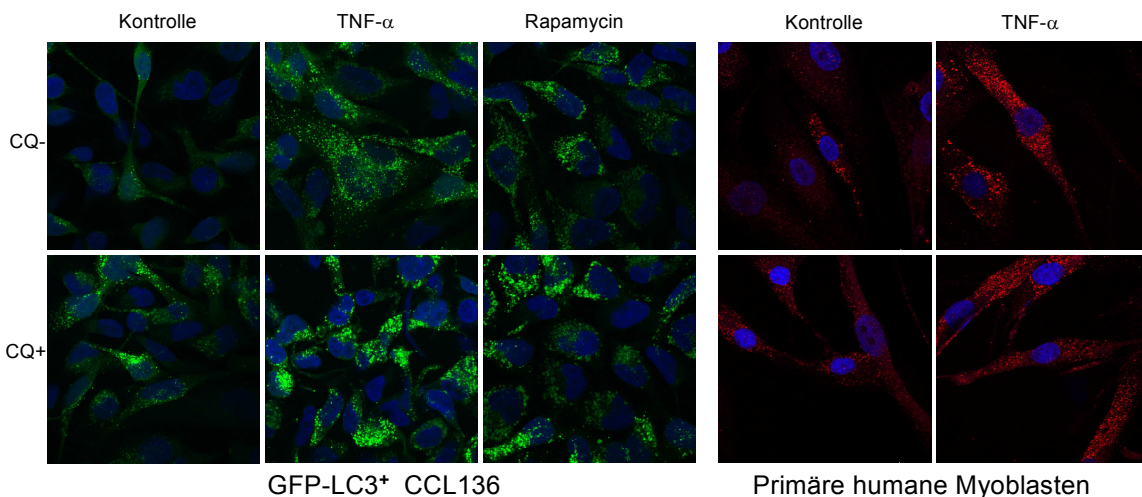
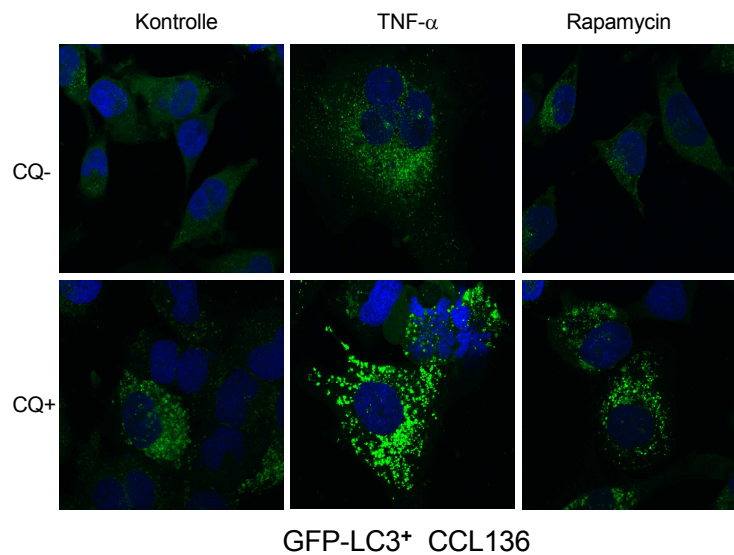
A**B****C**

Abbildung 4.3.2-2 (modifiziert nach KELLER et al. 2011): Analyse der LC3-Expression nach Inkubation mit TNF- α in An- und Abwesenheit von CQ mittels Konfokalmikroskopie. Die 24- (A) sowie 48- (B)stündige Exposition von Myoblasten gegenüber TNF- α (5 ng/ml) führte zu einer sichtbaren Zunahme GFP-LC3⁺-Vesikel sowohl in An- als auch in Abwesenheit des lysosomalen Azidifikationsinhibitors CQ (50 μ M, 10 h). Die Zunahme der GFP-LC3⁺-Vesikel war vergleichbar mit der Positivkontrolle RAP (1 μ g/ml). C: Auch die 24-stündige Exposition von primären humanen Myoblasten gegenüber TNF- α (5 ng/ml) führte sowohl in An- als auch in Abwesenheit des lysosomalen Azidifikationsinhibitors CQ (50 μ M, 10 h) zu einer sichtbaren Zunahme der LC3⁺-Vesikel. Die Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Die Aufnahmen wurden mittels Konfokalmikroskopie angefertigt.

Um zu evaluieren, ob die TNF- α -medierte Hochregulation der LC3-Expression ein ubiquitär zu beobachtender Effekt oder auf Myoblasten beschränkt ist, wurde in einem nächsten Schritt die Induktion von Makroautophagie durch TNF- α in der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCat sowie der Mammakarzinom-Zelllinie MDAMC untersucht. Während auch die MDAMC-Zelllinie suszeptibel gegenüber einer Hochregulation von LC3 durch Exposition zu TNF- α war, blieb in der HaCat-Zelllinie dieser Effekt aus. Obwohl somit die Induktion von Makroautophagie durch TNF- α nicht spezifisch für Myoblasten ist, so scheint sie doch nicht ubiquitär vorhanden zu sein.

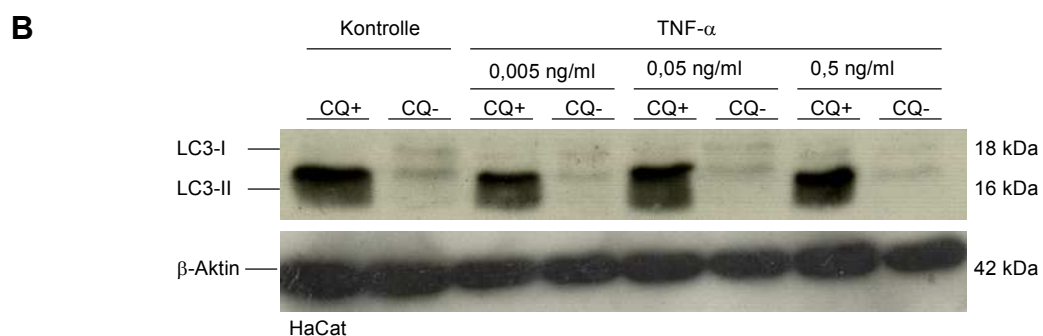
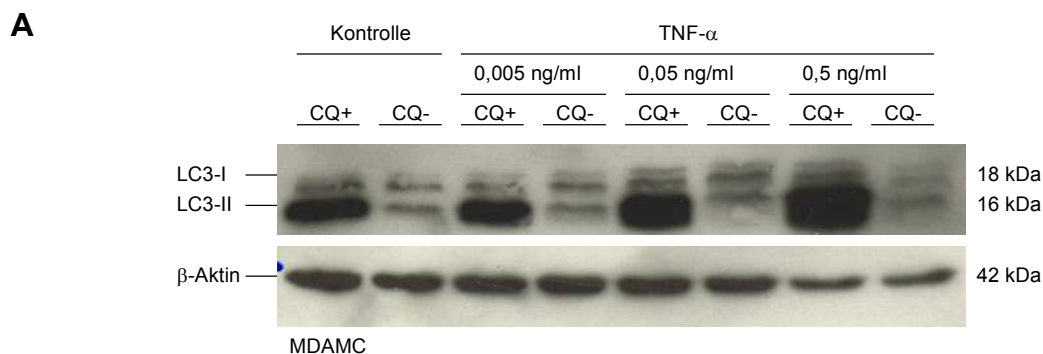


Abbildung 4.3.2-3 (modifiziert nach KELLER et al. 2011): TNF- α -medierte Induktion von Makroautophagie im Immunoblot ist kein ubiquitär zu beobachtender Effekt. A: Die 24-stündige Exposition der MDAMC-Zelllinie gegenüber TNF- α in den gleichen Konzentrationen, die bei der CCL136-Zelllinie eingesetzt wurden (0,005/0,05/0,5 ng/ml), führte im Immunoblot zu einer vergleichbaren konzentrationsabhängigen Zunahme der LC3-II-Expression und somit zu einer Induktion von Makroautophagie. B: Die gleichen Konzentrationen von TNF- α führten hingegen bei Exposition der HaCat-Zelllinie zu keiner veränderten LC3-Expression. Die CQ⁺-Proben wurden 10 h mit 50 μ M CQ inkubiert. Als Ladungskontrolle wurde der Nachweis von β -Aktin verwendet.

Mit den in *Punkt 4.3.1* und *Punkt 4.3.2* durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass Myoblasten der Zelllinie CCL136 Makroautophagie nicht nur auf basaler Ebene nutzen, sondern darüber hinaus auch suszeptibel gegenüber Zytokin-vermittelter Induktion von Makroautophagie sind. Unter den getesteten proinflammatorischen Substanzen führte nur TNF- α zu einer reproduzierbaren Induktion autophagischer Aktivität in Myoblasten.

4.4 Makroautophagie moduliert nicht die Suszeptibilität von Myoblasten gegenüber TNF- α -induziertem Zelltod

Da in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, dass Makroautophagie eine protektive Funktion gegenüber Apoptose einnehmen kann (WANG et al. 2008), sollte in einem nächsten Schritt analysiert werden, ob Myoblasten der CCL136-Zelllinie suszeptibel gegenüber TNF- α -Rezeptor-vermitteltem Zelltod sind. TNF-Rezeptor (Abk. TNF-R) 1 und TNF-R2 werden beide an der Oberfläche von humanen Myoblasten (DE BLEECKER et al. 1999) exprimiert. TNF-R1 bildet einen Signalübertragungs-Komplex, welcher sowohl den pro-apoptotischen Signalübertragungsweg über Caspase-8 als auch die anti-apoptotischen Signalkaskaden über NF- κ B und c-jun N-terminale Kinasen (Abk. JNK) aktiviert. Das Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellüberleben wird auf Ebene der Signalstärke, Regulation der Rezeptorexpression und Induktion anti-apoptotischer Gene moduliert. In den meisten Zelltypen führt der Signalübertragungsweg über TNF-R1 nur zum Zelltod, wenn der Überlebenssignalweg in diesen Zellen beispielsweise durch Inhibition der Proteinsynthese blockiert ist (GUPTA 2002).

Im Folgenden wurden Myoblasten der CCL136-Zelllinie mit aufsteigenden Konzentrationen von TNF- α in An- und Abwesenheit von Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid (Abk. CHX) inkubiert. Die Rate an apoptotischem Zelltod wurde nach 24 h durch die Quantifizierung der TO-PRO[®]-3-Permeabilität und der spezifischen DNA-Fragmentation in hypodiploiden Zellen in der Durchflusszytometrie gemessen (RICCARDI und NICOLETTI 2006). Myoblasten zeigten keinerlei Suszeptibilität gegenüber TNF- α -induziertem apoptotischen Zelltod in Abwesenheit von Cycloheximid. Jedoch konnte in Anwesenheit von Cycloheximid und TNF- α eine dosisabhängige Induktion von

apoptotischem Zelltod beobachtet werden. Die alleinige Inkubation von Myoblasten mit Cycloheximid führte zu keiner Induktion von Zelltod.

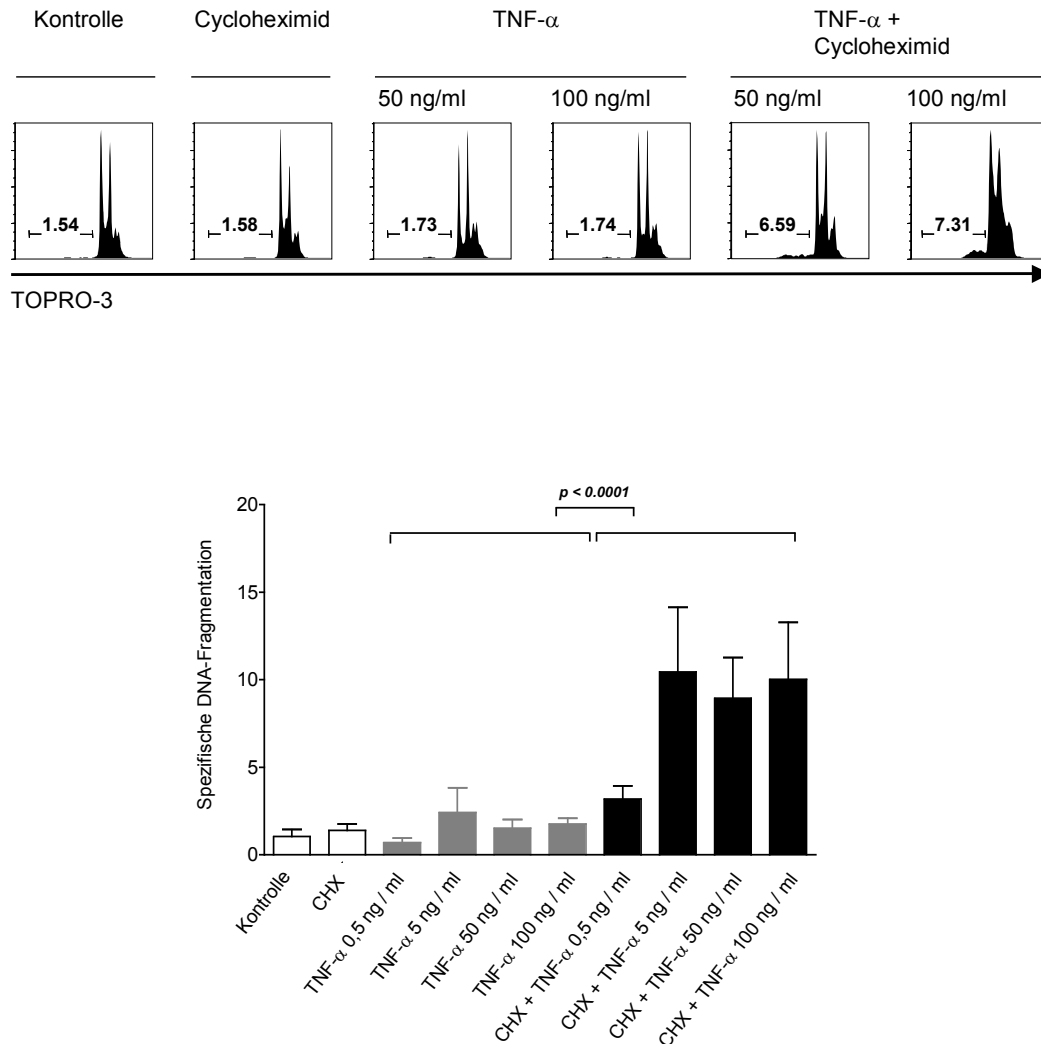


Abbildung 4.4-1 (modifiziert nach KELLER et al. 2011): Analyse der apoptotischen Zelltodrate in Myoblasten über die Detektion der DNA-Fragmentation mittels Durchflusszytometrie. CCL136-Zellen wurden mit TO-PRO[®]-3-Iodid, einer DNA-interkalierenden Substanz, gefärbt, um hypodiploide DNA-Scheitelwerte in der Durchflusszytometrie zu quantifizieren. Myoblasten, die 24 h mit CHX (1 µg/ml) bzw. TNF-α alleine inkubiert wurden, zeigen keine erhöhte DNA-Fragmentation im Vergleich zu der Kontrolle. Wurden die Myoblasten 24 h mit TNF-α in Anwesenheit von Proteinsynthese-Inhibitor CHX inkubiert, konnte eine signifikante Erhöhung der DNA-Fragmentation detektiert werden ($p < 0,0001$).

Ob eine Modulation von Makroautophagie in Myoblasten zu einer Veränderung der Suszeptibilität gegenüber TNF-α-vermitteltem Zelltod führt, war Gegenstand des folgenden Experiments. Hierzu wurde die DNA-Fragmentation unter *knock down* via ATG12-spezifischer siRNA bzw. Hochregulation von Makroautophagie durch Rapamycin-medierte mTOR-Inhibition in Myoblasten mittels Durchflusszytometrie detektiert. Weder ATG12-

spezifischer *knock down* noch die Inkubation mit Rapamycin zeigten einen Effekt auf die Suszeptibilität der Myoblasten gegenüber TNF- α -induzierter Apoptose.

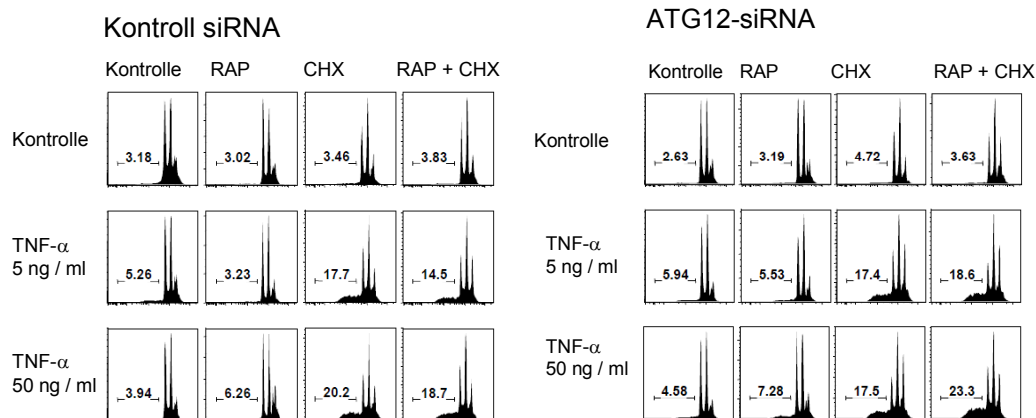


Abbildung 4.4-2 (modifiziert nach KELLER et al. 2011): Modulation von Makroautophagie verändert nicht die Suszeptibilität gegenüber TNF- α -induzierter Apoptose in humanen Myoblasten der CCL136-Zelllinie.

Weder die Inhibition von Makroautophagie durch ATG12-spezifische RNA-Interferenz, noch die Hochregulation von Makroautophagie unter Zuhilfenahme von RAP (1 μ g/ml) führten zu einer Veränderung der spezifischen DNA-Fragmentation.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Inhibition von Makroautophagie in Abhängigkeit des Zelltyps pro- oder anti-apoptotische Wirkung zeigen kann. Diese Effekte stehen in Abhängigkeit zu der Art des Stimulus und den darauffolgenden kompensatorischen Veränderungen innerhalb der Zelle und legen ein komplexes Zusammenspiel zwischen Makroautophagie und Zelltodsignalwegen nahe (WANG et al. 2008). In den in *Punkt 4.4* durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass, obwohl Makroautophagie in Skelettmuskelzellen durch TNF- α induziert werden kann, diese Zellen resistent gegenüber TNF-R vermitteltem Zelltod sind und Makroautophagie die Empfindlichkeit gegenüber TNF-R-vermittelter Apoptose nicht beeinflusst.

4.5 TNF- α reguliert die MHC-Expression in Myoblasten nach Inkubation mit IFN- γ

In der Vergangenheit konnte nachgewiesen werden, dass LC3⁺-Autophagosomen häufig mit Beladungskompartimenten der MHC-Klasse-II-Moleküle (Abk. MIICs) fusionieren (DORFEL et al. 2005, NIMMERJAHN et al. 2003, PALUDAN et al. 2005). In professionellen antigenpräsentierenden Zellen, wie beispielsweise DCs und B-Zellen, konnte eine Kolokalisation von LC3 und MHC-Klasse-II-Molekülen von bis zu 50 % nachgewiesen werden (SCHMID et al. 2007). Dies legt nahe, dass via Makroautophagie autophagosomaler Inhalt zu MIICs transportiert wird.

Obwohl einerseits MHC-Klasse-I-Antigene wie das Humane Leukozyten Antigen (HLA) -A, HLA-B und HLA-C von in Kultur gehaltenen humanen Myoblasten konstitutiv exprimiert werden, zeigen diese Zellen andererseits keine Expression des MHC-Klasse-II-Antigens HLA-DR. Durch das proinflammatorische Zytokin IFN- γ kann allerdings die Expression von MHC-Klasse-II-Antigenen induziert sowie die Expression von MHC-Klasse-I-Antigenen erhöht werden (HOHLFELD und ENGEL 1994, WIENDL et al. 2005). In aktivierter Form sind humane Muskelzellen mit den für die MHC-Klasse-II-Antigen-Prozessierung wesentlichen Bestandteilen ausgestattet und in der Lage, sowohl exogene als auch endogene Antigene gegenüber CD4⁺-T-Zellen zu präsentieren (GOEBELS et al. 1992, MICHAELIS et al. 1993). Um zu untersuchen, in welcher Weise TNF- α an der Regulation der MHC-Klasse-I- bzw. -II-Antigene beteiligt ist, wurden primäre humane Muskelzellen gegenüber TNF- α , IFN- γ sowie einer Kombination dieser beiden proinflammatorischen Zytokine über 48 h exponiert. Im Anschluss an diese Behandlung wurden die MHC-Klasse-I- und -II-Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. In den unbehandelten Myoblasten konnten keine MHC-Klasse-II-Antigene (HLA-DR) detektiert werden, wohingegen MHC-Klasse-I-Antigene (HLA-A, -B und -C) in geringer Konzentration nachgewiesen werden konnten. Um herauszufinden, ob es zu einer Modulation der MHC-Klasse-I- und -II-Expression durch Exposition gegenüber TNF- α kommt, wurden die Myoblasten im Folgenden mit diesem proinflammatorischen Zytokin inkubiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es unter Anwesenheit von TNF- α zwar zu einer Zunahme der MHC-Klasse-I-Antigene, nicht aber der MHC-Klasse-II-Antigene kommt. Die Behandlung mit IFN- γ hingegen führte sowohl zu einer Induktion der MHC-Klasse-I-Antigene als auch der MHC-Klasse-II-Antigene. Obwohl die alleinige Exposition der Myoblasten gegenüber TNF- α zu keiner erhöhten HLA-DR-Expression führte, konnten nach Kombinationsbehandlung mit IFN- γ erhöhte MHC-Klasse-II-Oberflächenmarker detektiert werden. Dieser synergistische Effekt konnte auch bei dem Nachweis der MHC-Klasse-I-Oberflächenmarker beobachtet werden. Um untersuchen zu können, ob es sich bei den beschriebenen Ergebnissen um Zelltyp-spezifische Phänomene oder um ubiquitär nachweisbare Auswirkungen handelt, wurden Zellen der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCat der gleichen Behandlung unterzogen. Hierbei konnte kein synergistischer Effekt im Rahmen der Kombinationsbehandlung mit TNF- α und IFN- γ bei der Detektion von MHC-Klasse-II-Molekülen nachgewiesen werden. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass Zellen der HaCat-Zelllinie nicht suszeptibel gegenüber TNF- α -mediierter Hochregulation von Makroautophagie sind (siehe *Abbildung 4.3.2-3*).

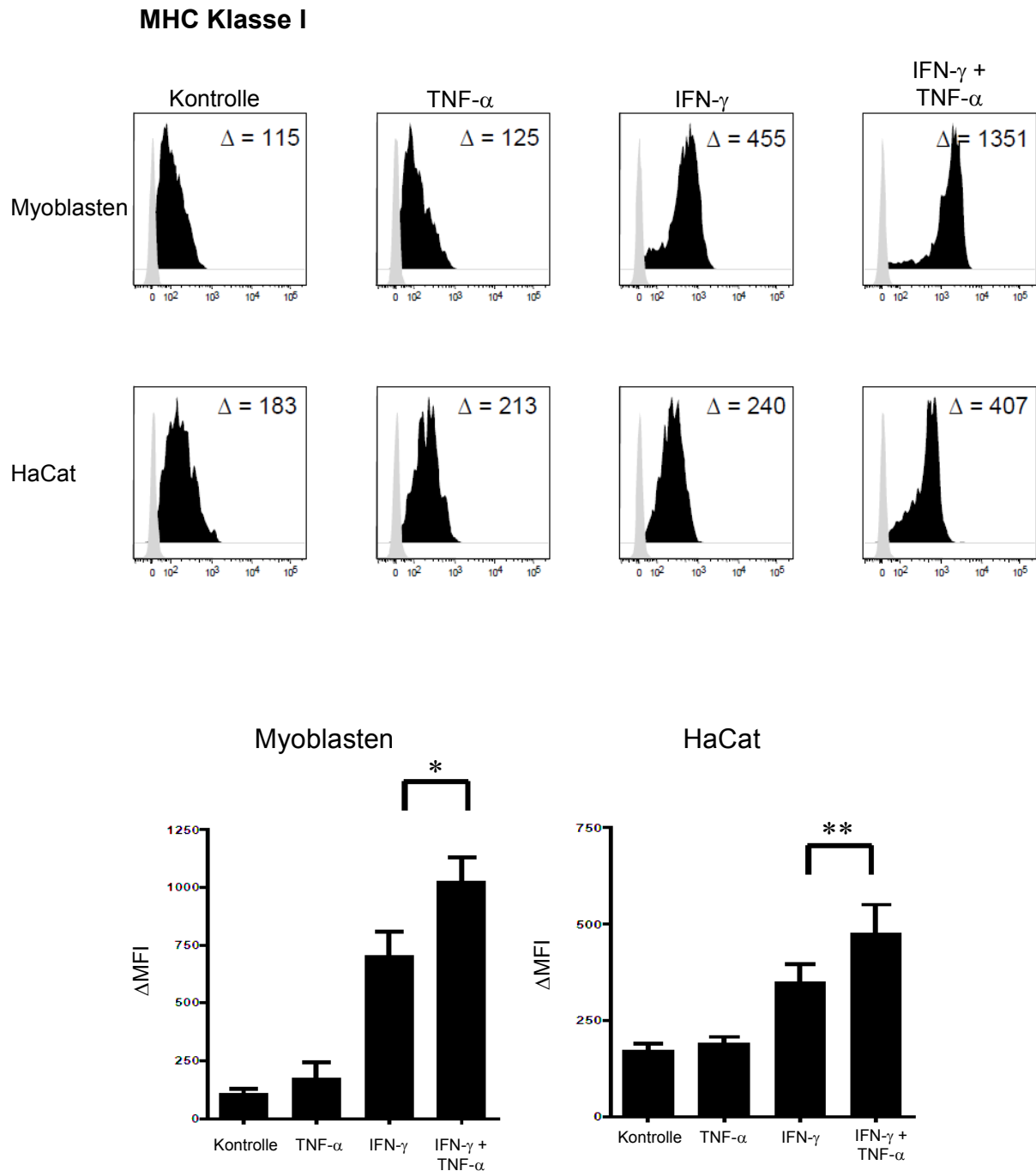


Abbildung 4.5-1 (modifiziert nach KELLER et al. 2011): Durchflusszytometrische Bestimmung von MHC-Klasse-I-Oberflächenmarkern. Myoblasten und Zellen der humanen Keratinozytenzelllinie HaCat exprimieren konstitutiv MHC-Klasse-I-Antigene auf ihrer Oberfläche. Die Exposition beider Zelltypen gegenüber TNF- α (50 ng/ml) bzw. IFN- γ (100 ng/ml) sowie einer Kombinationsbehandlung beider Zytokine über 48 h führte zu einer Hochregulation der MHC-Klasse-I-Antigene (HLA-A, -B und -C). Die Isotypenkontrolle der durchflusszytometrischen Untersuchung wurde in grau wiedergegeben. Die Zahlen der individuellen Histogramme geben die mittlere Fluoreszenzintensität im Vergleich mit der Isotypenkontrolle wieder (Δ MFI). Die Analyse der MHC-Klasse-I-Expression wurde mit Hilfe des gepaarten t-Tests durchgeführt (*p = 0,04; **p = 0,02).

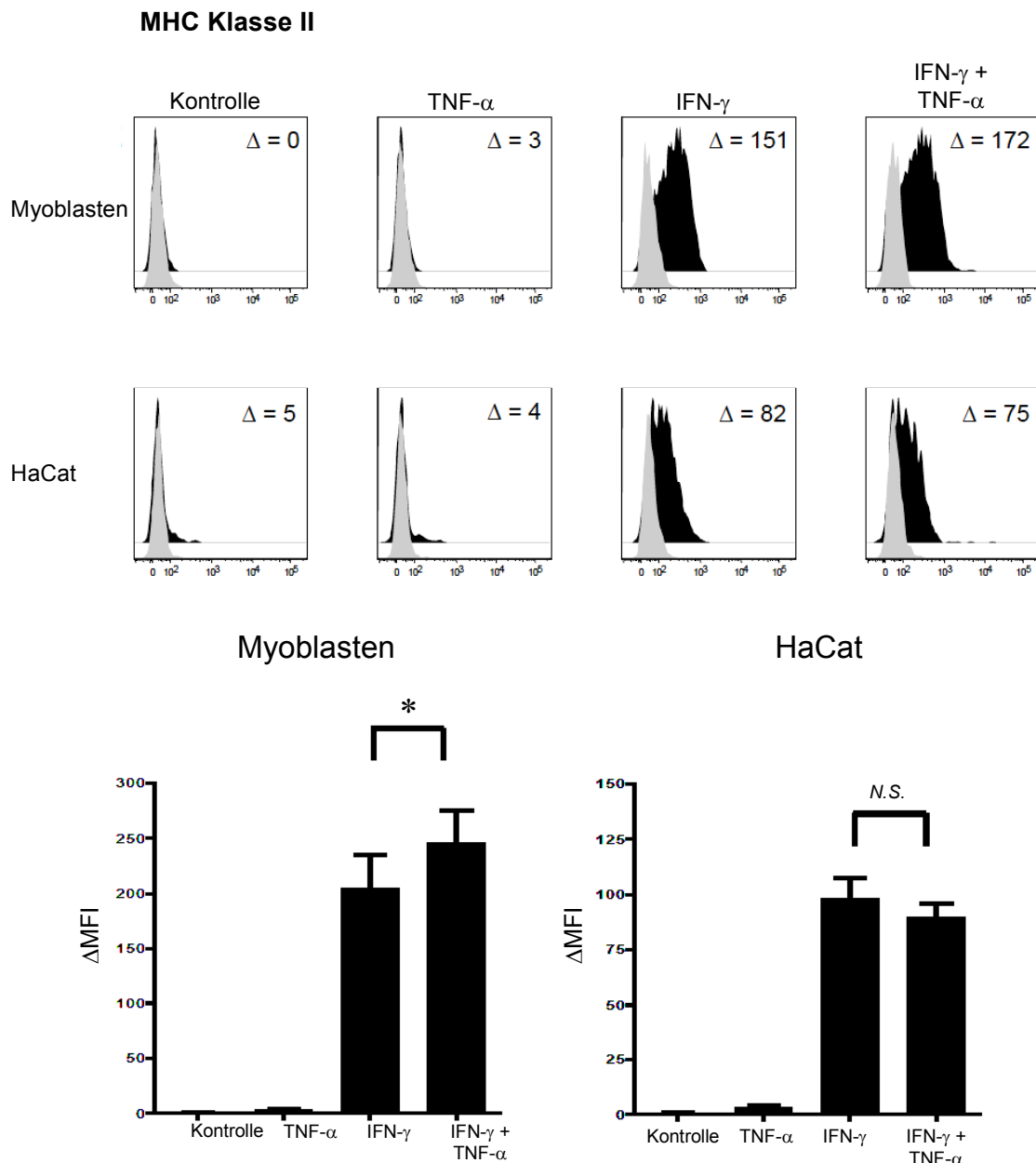


Abbildung 4.5-2 (modifiziert nach KELLER et al. 2011): Durchflusszytometrische Bestimmung von MHC-Klasse-II-Oberflächenmarkern. Myoblasten und Zellen der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCat zeigen keine konstitutive Expression von MHC-Klasse-II-Antigenen (HLA-DR) auf ihrer Oberfläche. Die Exposition beider Zelltypen gegenüber IFN- γ (100 ng/ml) führte zu einer Hochregulation der MHC-Klasse-II-Antigene. Durch alleinige Inkubation mit TNF- α (50 ng/ml) konnte in keinem der beiden Zelltypen eine Hochregulation der HLA-DR-Moleküle beobachtet werden. Allerdings führte die Kombinationsbehandlung von IFN- γ und TNF- α zu einer erhöhten HLA-DR-Detektion in Myoblasten. Dieser Effekt konnte in Zellen der HaCat-Zelllinie nicht beobachtet werden. Beide Zelltypen wurden jeweils über 48 h mit den entsprechenden Zytokinen inkubiert. Die Isotypenkontrolle der durchflusszytometrischen Untersuchung wurde in grau wiedergegeben. Die Zahlen der individuellen Histogramme geben die mittlere Fluoreszenzintensität im Vergleich mit der Isotypenkontrolle wieder. (Δ MFI). Die Analyse der MHC-Klasse-II-Expression wurde mit Hilfe des gepaarten t-Tests durchgeführt (* $p = 0,002$).

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Induktion von Makroautophagie durch $\text{TNF-}\alpha$ und der Hochregulation der MHC-Klasse-II-Oberflächenmarker in mit $\text{IFN-}\gamma$ -behandelten Myoblasten besteht. Hierzu wurden zunächst Myoblasten mit Konzentrationen von $\text{TNF-}\alpha$ inkubiert, welche in bereits beschriebenen Experimenten zu einer suffizienten Hochregulation von Makroautophagie geführt hatten (siehe *Abbildung 4.3.2-1*). Um untersuchen zu können, ob die Inkubation von Myoblasten mit $\text{TNF-}\alpha$ zu einer erhöhten Neusynthese von HLA-DR-Molekülen führt oder es zu einer Translokation bereits intrazellulär bestehender HLA-DR-Moleküle kommt, wurde die HLA-DR-Expression von permeabilisierten und nicht-permeabilisierten Myoblasten mittels Durchflusszytometrie gemessen. Wie in *Abbildung 4.5-3* ersichtlich wird, ist der synergistische Effekt der Kombinationsbehandlung mit $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ im Hinblick auf die HLA-DR-Expression nur in den nicht-permeabilisierten Myoblasten nachweisbar.

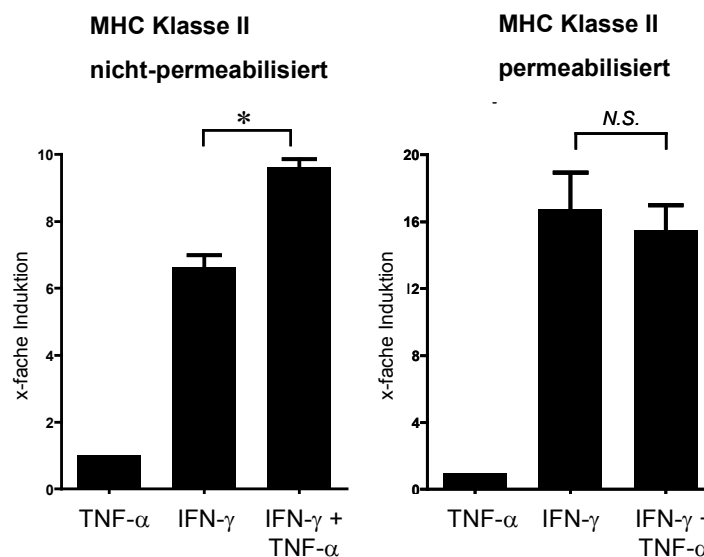


Abbildung 4.5-3 (modifiziert nach KELLER et al. 2011): Durchflusszytometrische Untersuchung des synergistischen Effekts von $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ auf die MHC-Klasse-II-Regulation. Die Bestimmung der Expression von HLA-DR erfolgte nach Inkubation der Myoblasten über 48 h mit den entsprechenden Zytokinen $\text{TNF-}\alpha$ (50 ng/ml) und $\text{IFN-}\gamma$ (100 ng/ml). Die zusätzliche Inkubation der mit $\text{IFN-}\gamma$ behandelten Myoblasten mit $\text{TNF-}\alpha$ führte zu einem signifikanten Anstieg der HLA-DR-Expression gegenüber den ausschließlich mit $\text{IFN-}\gamma$ inkubierten Myoblasten. Dieser synergistische Effekt der Kombinationsbehandlung mit $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ im Hinblick auf die Hochregulation von HLA-DR war nur in den nicht-permeabilisierten Myoblasten nachweisbar (linkes Diagramm, * $p = 0,03$). Um die Zellmembranen der Myoblasten zu permeabilisieren, wurden die Zellen in 0,5 %iger Saponinlösung bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Bei den Myoblasten mit permeabilisierter Zellmembran konnte kein signifikanter Unterschied der Expression von HLA-DR zwischen der alleinigen Behandlung mit $\text{IFN-}\gamma$ und der Kombinationsbehandlung mit $\text{TNF-}\alpha$ festgestellt werden (rechtes Diagramm).

Die Ergebnisse, die in *Abbildung 4.5-3* dargestellt werden, legen nahe, dass $\text{TNF-}\alpha$ im Gegensatz zu $\text{IFN-}\gamma$ nicht die Neusynthese von HLA-DR-Molekülen induziert, sondern vielmehr zu einer Umverteilung bereits intrazellulär bestehender HLA-DR-Moleküle an die Zelloberfläche führt. Daraufhin wurde der Zusammenhang zwischen der $\text{TNF-}\alpha$ -vermittelten Translokation von HLA-DR-Molekülen und Makroautophagie genauer untersucht. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass 3-MA als spezifischer Inhibitor von Makroautophagie fungiert (SEGLEN und GORDON 1982). Die im Folgenden erneut durchgeführte Inkubation von Myoblasten mit $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ und einer Kombination dieser beiden Zytokine in An- und Abwesenheit des spezifischen Makroautophagie-Inhibitors 3-MA zeigte, dass es unter pharmakologischer Inhibition von Makroautophagie zu einem Verlust des synergistischen Effekts der Kombinationsbehandlung von $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ im Hinblick auf die Expression von HLA-DR kommt.

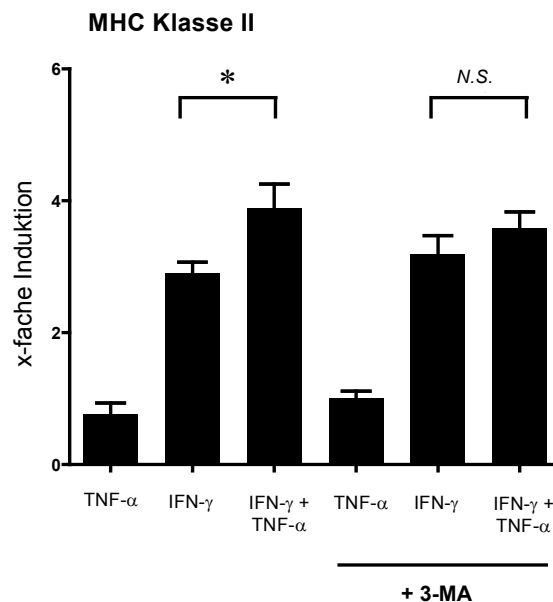


Abbildung 4.5-4 (modifiziert nach KELLER et al. 2011): Durchflusszytometrische Untersuchung des synergistischen Effekts von $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ auf die MHC-Klasse-II-Regulation in An- und Abwesenheit des spezifischen Makroautophagie-Inhibitors 3-MA. Die Bestimmung der Expression von HLA-DR erfolgte nach Inkubation der Myoblasten über 48 h mit den entsprechenden Zytokinen $\text{TNF-}\alpha$ (50 ng/ml) und $\text{IFN-}\gamma$ (100 ng/ml). Die zusätzliche Inkubation der mit $\text{IFN-}\gamma$ behandelten Myoblasten mit $\text{TNF-}\alpha$ führte zu einem signifikanten Anstieg der HLA-DR-Expression gegenüber den ausschließlich mit $\text{IFN-}\gamma$ inkubierten Myoblasten (* $p = 0,04$). Dieser synergistische Effekt der Kombinationsbehandlung mit $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ im Hinblick auf die Hochregulation von HLA-DR war in Anwesenheit des spezifischen Makroautophagie-Inhibitors 3-MA (10 mM) reversibel.

Die unter *Punkt 4.5* beschriebenen Experimente zeigen, dass $\text{TNF-}\alpha$ in Anwesenheit von $\text{IFN-}\gamma$ sowohl die Expression von MHC-Klasse-I- als auch von -Klasse-II-Molekülen in

Myoblasten reguliert. Die Ergebnisse verdeutlichen weiterhin, dass der synergistische Effekt von TNF- α und IFN- γ auf die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-II-Molekülen unter Inhibition von Makroautophagie reversibel ist und legen somit einen funktionellen Zusammenhang zwischen TNF- α -mediierter Hochregulation von Makroautophagie und MHC-Klasse-II-Expression nahe.

4.6 Modulation der Degradation von APP und β -Amyloid durch TNF- α -medierte Induktion von Makroautophagie

Um zu untersuchen, ob es unter TNF- α -mediierter Induktion von Makroautophagie zu einer Modulation der Prozessierung von APP kommt, wurden Myoblasten der Zelllinie CCL136 mit TNF- α sowie dem Makroautophagie-Induktor Rapamycin inkubiert. Hierzu wurden Konzentrationen eingesetzt, von denen bereits gezeigt wurde, dass sie Makroautophagie in den Myoblasten suffizient induzieren konnten (siehe *Abbildung 4.3.2-1*). Die Detektion im Rahmen eines Immunoblots erfolgte mit dem monoklonalen 6E10-Antikörper, der gegen ein Epitop in der Aminosäuresequenz 1-17 der β -Amyloidsequenz innerhalb des APP gerichtet ist.

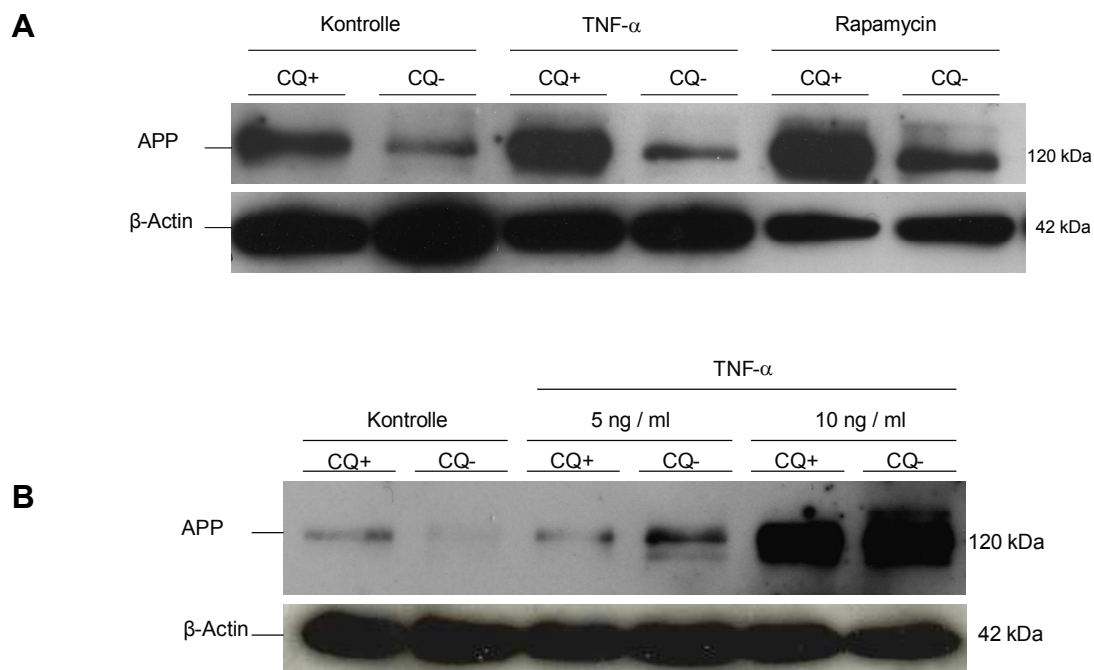


Abbildung 4.6-1: Erhöhte Akkumulation von APP durch Inkubation von Myoblasten mit TNF- α und Rapamycin im Immunoblot. A: Die 48-stündige Exposition von Myoblasten der Zelllinie CCL136 gegenüber TNF- α (10 ng/ml) bzw. RAP (1 μ g/ml) führte zu einer sichtbaren Zunahme von APP sowohl in An- als auch in Abwesenheit von CQ (50 μ M, 10 h). Als Ladungskontrolle wurde der Nachweis von β -Aktin verwendet. B: Die 48-stündige Exposition von Myoblasten der Zelllinie CCL136 gegenüber TNF- α (5 ng/ml bzw. 10 ng/ml) zeigte einen konzentrationsabhängigen Effekt hinsichtlich der vermehrten Akkumulation von APP im Immunoblot. Wenngleich

es bei einer TNF- α -Konzentration von 5 ng/ml noch kaum zu einer erkennbaren Akkumulation von APP kam, so führte eine TNF- α -Konzentration von 10 ng/ml bereits zu einer deutlichen Verstärkung des Signals im Immunoblot. Als Ladungskontrolle wurde der Nachweis von β -Aktin verwendet.

Um zu untersuchen, ob die Exposition der Myoblasten zu TNF- α auch zu vermehrter Akkumulation des 4 kDa großen APP-Spaltprodukts β -Amyloid führt, wurden die Zellen nach 48-stündiger Exposition gegenüber TNF- α und unter Verwendung des monoklonalen 6E10-Antikörpers im Immunoblot hinsichtlich einer Erhöhung von APP-Spaltprodukten untersucht. Auf Höhe der 7 kDa-Bande konnte eine deutliche Signalerhöhung detektiert werden. Da der 6E10-Antikörper gegen ein Epitop in der Aminosäuresequenz 1-17 der β -Amyloidsequenz innerhalb des APP gerichtet ist, kann es sich bei der Signalerhöhung um Akkumulationen von APP-Spaltprodukten wie beispielsweise β -CTF (C99) und Dimere des β -Amyloids handeln.

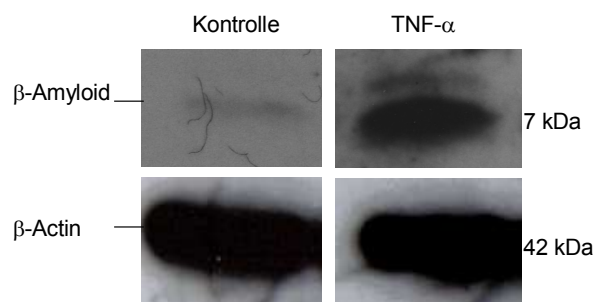


Abbildung 4.6-2: Erhöhte Akkumulation von APP-Spaltprodukten durch Inkubation von Myoblasten mit TNF- α im Immunoblot. Die 48-stündige Exposition von Myoblasten der Zelllinie CCL136 gegenüber TNF- α (10 ng/ml) führte zu einer sichtbaren Zunahme von APP-Spaltprodukten. Als Ladungskontrolle wurde der Nachweis von β -Aktin verwendet.

Um die TNF- α -medierte Akkumulation von Amyloid-Aggregaten weiter zu verifizieren, wurde eine immunfluoreszente Färbung mit ThioflavinS durchgeführt. Die ThioflavinS-Färbung dient dem Nachweis von β -Amyloid-Aggregaten, indem es spezifisch β -Faltblattstrukturen bzw. Aggregate aus β -Faltblattanordnungen fluoreszent anfärbt (BUSSIÈRE et al. 2004).

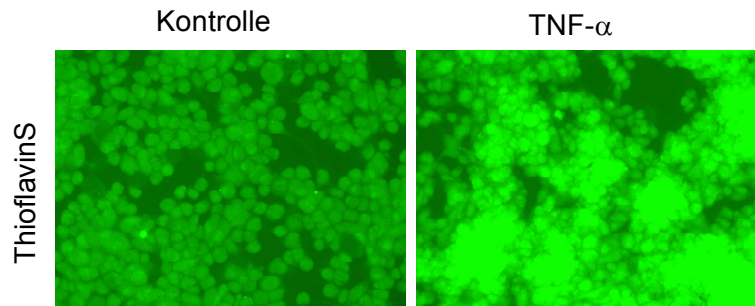
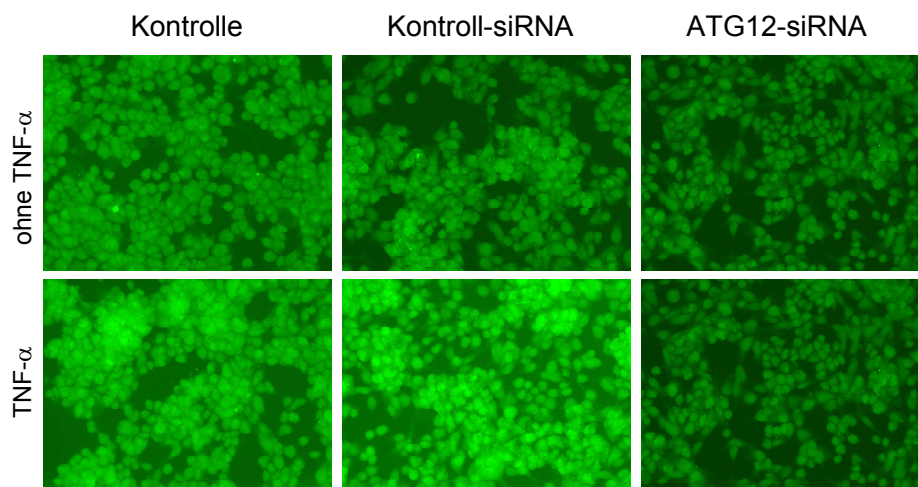


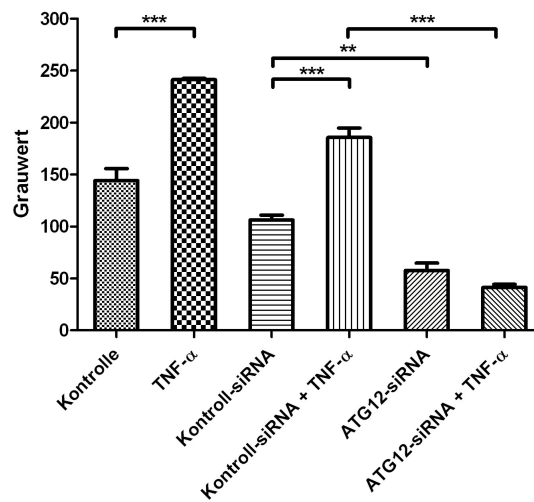
Abbildung 4.6-3: Immunfluoreszenter Nachweis von β -Amyloid-Aggregaten mittels ThioflavinS-Färbung in Myoblasten nach Inkubation mit TNF- α . Die 48-stündige Behandlung von Myoblasten der Zelllinie CCL136 mit TNF- α (10 ng/ml) führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer Zunahme des ThioflavinS-Signals in der Immunfluoreszenz. Die Aufnahmen wurden mit einem 20 \times Objektiv angefertigt.

Da bereits nachgewiesen werden konnte, dass die Inkubation von Myoblasten mit TNF- α einerseits zu einer Hochregulation von Makroautophagie führt und andererseits die Akkumulation von APP bzw. dessen Spaltprodukten wie beispielsweise Dimeren des β -Amyloid unterhält, sollte in der folgenden Versuchsanordnung analysiert werden, ob die TNF- α -vermittelte Akkumulation von β -Amyloid-Aggregaten in Myoblasten durch Inhibition von Makroautophagie mittels ATG12-spezifischer siRNA sowie des pharmakologischen Makroautophagie-Inhibitors 3-MA moduliert werden kann. Hierbei zeigte sich, dass sowohl durch spezifische RNA-Interferenz als auch unter Anwendung von 3-MA das ThioflavinS-Signal in der Immunfluoreszenz reduziert werden konnte und somit die Verminderung makroautophagischer Aktivität in Myoblasten zu einer geringeren Akkumulation von β -Amyloid-Aggregaten führte.

A



B



C

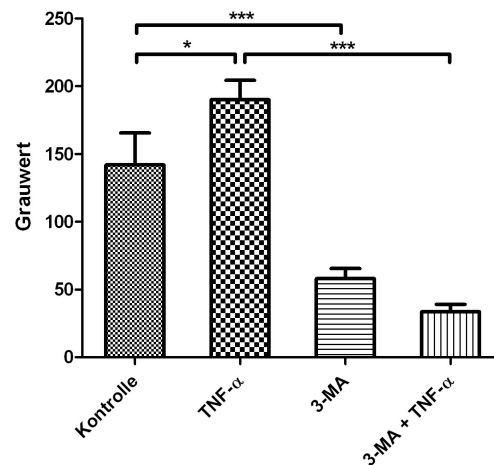


Abbildung 4.6-4: Nachweis von β -Amyloid-Aggregaten mittels ThioflavinS-Färbung in Myoblasten nach Inkubation mit TNF- α unter Inhibition von Makroautophagie mittels ATG12-spezifischer siRNA sowie des pharmakologischen Inhibitors 3-MA. A: Myoblasten der Zelllinie CCL136 wurden 48 h gegenüber TNF- α exponiert. Die in der Folge erhöhte β -Amyloid-Aggregation zeigte sich in einer Verstärkung des ThioflavinS-Signals in der Immunfluoreszenz und konnte unter Inhibition von Makroautophagie mittels RNA-Interferenz nicht beobachtet werden. Die Aufnahmen wurden mit einem 20 \times Objektiv angefertigt. Auch die quantitative Grauwert-Analyse der ThioflavinS-Färbungen zeigt, dass es unter Inhibition von Makroautophagie mittels siRNA (B) sowie 3-MA (C) zu einer deutlichen Reduktion der Amyloid-Aggregate in den Myoblasten kommt. Die Myoblasten wurden 48 h gegenüber TNF- α (10 ng/ml) und 3-MA (10 mM) inkubiert (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

5. Diskussion

5.1 Einleitung

Das charakteristische Merkmal der Pathologie der sIBM ist das simultane Vorliegen inflammatorischer und degenerativer Vorgänge im Skelettmuskel der Erkrankten (DALAKAS 2006). Typischerweise lassen sich im sIBM-Muskel neben multifokalen lymphozytären Infiltraten (MUNTZING et al. 2003) und einer Hochregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen (WIENDL et al. 2005) auch eine Überexpression verschiedener proinflammatorischer Zytokine identifizieren (SCHMIDT et al. 2008). Zu den degenerativen Veränderungen innerhalb des Muskels zählen das Auftreten lysosomaler Vakuolen, Überexpression von APP sowie intrazelluläre Einschlusskörper mit Akkumulation von Degenerationsmarkern wie β -Amyloid (MENDELL et al. 1991).

Makroautophagie ist vor allem unter Nährstoffdepletion neben dem Ubiquitin-Proteasomen-System (Abk. UPS) der wichtigste Degradationsmechanismus innerhalb der eukaryotischen Zelle und konnte mit der Entstehung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (NIXON 2006, VENTRUTI und CUERVO 2007).

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Rolle der Makroautophagie als Bindeglied zwischen Zytokin-vermitteltem Zellstress, MHC-Expression und Akkumulation von β -Amyloid in Skelettmuskelzellen zu untersuchen.

5.2 Makroautophagie als konstitutiv aktiver Prozess in humanen Skelettmuskelzellen

Nachdem ursprünglich vermutet wurde, dass Makroautophagie lediglich einen nicht-selektiven Degradationsmechanismus vor dem Hintergrund eines zellulären Nährstoffmangels darstellt, gelang in der Vergangenheit der Nachweis, dass der Prozess in zahlreichen Zelltypen selbst auf einem basalen Niveau exekutiert wird und eine wichtige Rolle bei der Eliminierung unerwünschter Proteine in der Zelle spielt (MIZUSHIMA et al. 2004, UCHIYAMA et al. 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zunächst mittels Analyse des Autophagosomenmarkers LC3 nachgewiesen werden, dass es sich bei Makroautophagie um einen in humanen Skelettmuskelzellen konstitutiv ablaufenden Prozess handelt, welcher selbst unter ausreichendem Nährstoffangebot in der Zelle aktiv ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich in der Rhabdomyosarkom-Zelllinie CCL136 Makroautophagie über Rapamycin-vermittelte Inhibition von mTOR hochregulieren lässt und der Einsatz einer ATG12-spezifischen siRNA zu verminderter makroautophagischer Aktivität führt. Anhand dieser Daten lässt sich zeigen, dass Makroautophagie in Skelettmuskelzellen nicht nur als *ultima ratio* im Angesicht eines akuten Nährstoffmangels hochreguliert wird, sondern

vielmehr auf einem basalen Niveau in diesem Zelltyp abläuft. Dies lässt sich mit der Erkenntnis in Einklang bringen, dass eine basale Aktivität der Autophagie in Skelettmuskelzellen zur Aufrechterhaltung der Muskelmasse notwendig ist und ihre Inhibition zu Myotrophie und mitochondrialen Schäden führen kann (MASIERO et al. 2009).

5.3 Zytokin-vermittelte Regulation von Makroautophagie in Sklettmuskelzellen

Infiltrate zytotoxischer T-Zellen in Muskelfasern der sIBM stellen ein wichtiges morphologisches Kriterium der Erkrankung dar (DALAKAS 2006). In der sIBM kommt es zu einer Überexpression verschiedener proinflammatorischer Moleküle, welche nicht nur von den beteiligten Immunzellen sezerniert werden, sondern auch von den Muskelfasern selbst (SCHMIDT et al. 2008). Zusätzlich konnten auch myeloide DCs vor allem in Arealen nicht-nekrotischer Muskelfasern im sIBM-Muskel identifiziert werden (GREENBERG et al. 2007). Zentraler Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Frage, ob Zytokine bzw. Chemokine, welche von den an der sIBM beteiligten Immunzellen bzw. Muskelzellen sezerniert werden, an der Regulation von Makroautophagie beteiligt sind. Hierzu wurden Muskelzellen gegenüber Überständen aus aktivierten T-Zell- sowie myeloiden DC-Kulturen exponiert, um sie auf ihre Fähigkeit zu untersuchen, Makroautophagie in Muskelzellen zu modulieren. Unter allen untersuchten inflammatorischen Molekülen zeigte nur TNF- α einen konzentrationsabhängigen, konsistenten Effekt hinsichtlich einer Induktion von Makroautophagie. TNF- α wird vor allem von Makrophagen produziert und lässt sich auch im Endo- und Perimysium von Muskelfasern der sIBM sowie anderer inflammatorischer Myopathien nachweisen (DE BLEECKER et al. 1999, LUNDBERG et al. 1995, SCHMIDT et al. 2008). Dieses proinflammatorische Zytokin unterhält normalerweise ein Entzündungsgeschehen durch Erhöhung der vaskulären Permeabilität und endothelialer Zelladhäsion sowie über die Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen wie DCs und Makrophagen. In Ewing-Sarkom-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass es unter fehlender NF κ B-Aktivierung durch die Exposition gegenüber TNF- α zu einer Induktion von Makroautophagie kommt (DJAVAHERI-MERGNY et al. 2006). Verschiedene Interferone und die Stimulation von Mitgliedern der TNF/TNFR-Superfamilie wie beispielsweise CD40-CD40-Ligand konnten bereits als Regulatoren von Makroautophagie identifiziert werden. Hierbei kommt der Makroautophagie vor allem während der Wirtszellantwort gegenüber intrazellulären Pathogenen eine tragende Rolle zu (ANDRADE et al. 2006, MILLS et al. 2004). So evadiert beispielsweise das Herpes-Simplex-Virus (Abk. HSV)-1 einer suffizienten Wirtszellantwort durch Inhibition von Makroautophagie über Bindung von Beclin-1 (ORVEDAHL et al. 2007). Der IFN-induzierbaren eIF2 α -Kinase kommt möglicherweise eine Bedeutung bei der Regulation von Makroautophagie im Rahmen einer HSV-I-Infektion zu (TALLOCY et al. 2002). Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch IFN- γ ist

von entscheidender Bedeutung für die Wirtsabwehr von Pathogenen. IFN- γ induziert normalerweise eine Reihe von Mediatoren, welche es potenziellen Pathogenen erschweren, in der Wirtszelle zu überleben. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass IFN- γ in Mäusen die Degradation von *Mycobacterium tuberculosis* und *Rickettsia conorii* über Induktion von Makroautophagie erhöhen kann und die Entfernung mykobakteriellen Materials aus der Zelle heraus über immunitätsbezogene GTPasen vorantreibt (GUTIERREZ et al. 2004, SINGH et al. 2006, TAYLOR et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein IFN- γ -vermittelter Effekt hinsichtlich einer Regulation von Makroautophagie nachgewiesen werden. Möglicherweise unterliegt die Regulation von Makroautophagie durch proinflammatorische Zytokine gewebespezifischen Unterschieden. Darüber hinaus könnte Maus-Gewebe grundsätzlich suszeptibler gegenüber IFN- γ -vermittelter Regulation von Makroautophagie sein, da in Mäusen die immunitätsbezogene GTPase im Gegensatz zu der im Menschen IFN- γ -induzierbar ist (BEKPEN et al. 2005).

5.4 Makroautophagie und TNF- α -vermittelter Zelltod

Zwischen Makroautophagie und Zelltod-Stoffwechselwegen bestehen komplexe Interaktionen. Je nach Art des Zelltod-Stimulus und damit einhergehenden kompensatorischen Prozessen innerhalb der Zelle kann Inhibition von Makroautophagie eine pro- bzw. anti-apoptotische Rolle einnehmen (WANG et al. 2008). In Abhängigkeit des zellulären Kontext nimmt somit Makroautophagie eine gegensätzliche Funktion im Hinblick auf das Zellüberleben ein. Die genaue molekulare Maschinerie, welche sich für das Umschalten zwischen diesen beiden Funktionen verantwortlich zeigt, bleibt weiterhin im Dunkeln. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass es in Myoblasten unter Behandlung von TNF- α und gleichzeitiger Proteinsynthesehemmung durch CHX zu einer konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose kam. Allerdings zeigte die Modulation von Makroautophagie weder durch Hochregulation mittels Rapamycin noch durch Inhibition via ATG12-spezifischer siRNA eine höhere Suszeptibilität gegenüber TNFR-vermittelter Apoptose. Interessanterweise konnte bereits früher gezeigt werden, dass Apoptose in Skelettmuskelzellen der sIBM und anderer inflammatorischer Myopathien nur eine untergeordnete Rolle spielt (FYHR et al. 2002, VARADHACHARY et al. 2010) und Skelettmuskelzellen im Allgemeinen vergleichsweise resistent gegenüber programmiertem Zelltod zu sein scheinen.

5.5 TNF- α -vermittelte Regulation der MHC-Expression in humanen Skelettmuskelzellen

Obwohl Skelettmuskelzellen normalerweise keine konstitutive MHC-Klasse-II-Expression an ihrer Oberfläche zeigen, kann durch Exposition der Zellen zu proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α eine Hochregulation dieses Moleküls erreicht werden mit

dem Ziel, exo- sowie endogene Antigene gegenüber CD4⁺-T-Zellen zu präsentieren (CURNOW et al. 2001, GOEBELS et al. 1992, MICHAELIS et al. 1993). In Antigen-präsentierenden Zellen wird sowohl die konstitutive als auch die IFN- γ -induzierbare Hochregulation von MHC-Klasse-II-Molekülen maßgeblich über den MHC-Klasse-II-Transaktivator (Abk. CIITA) als transkriptionellen Ko-Aktivator reguliert (STEIMLE et al. 1994). Es wurde bereits diskutiert, ob TNF- α möglicherweise die MHC-Klasse-II-Expression in nicht-professionellen Antigen-präsentierenden Zellen über einen dem CIITA nachgeschalteten bzw. von diesem unabhängigen Mechanismus erhöht (NIKCEVICH et al. 1999). Ferner konnte gezeigt werden, dass die CIITA-unabhängige Induktion von MHC-Klasse-II-Molekülen durch TNF- α eher die Präsentation von endogenen im Gegensatz zu exogenen Peptiden unterhält (ARANCIBIA-CARCAMO et al. 2004). Auch wurde bereits anhand des Epstein-Barr-Virus (Abk. EBV)-spezifischen nukleären Antigens (Abk. EBNA)1 nachgewiesen, dass Makroautophagie an der Präsentation endogener viraler Antigene durch MHC-Klasse-II-Moleküle beteiligt ist. Der Autophagie-vermittelten Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen mit endogenen Antigenen könnte eine Bedeutung im Rahmen entzündlicher Veränderungen in Geweben zukommen, welche MHC-Klasse-II-Moleküle hochregulieren (PALUDAN et al. 2005). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es nach Exposition von Myoblasten zu TNF- α in Kombination mit IFN- γ zu einer Induktion von MHC-Klasse-II-Molekülen in nicht-permeabilisierten Myoblasten kommt. Wurde die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen in permeabilisierten Myoblasten untersucht, konnte dieser synergistische Effekt zwischen TNF- α und IFN- γ nicht mehr nachgewiesen werden, was die Annahme nahelegt, dass TNF- α nicht zu einer Erhöhung der *de-novo*-Synthese von MHC-Klasse-II-Molekülen führt, sondern vielmehr eine Translokation bereits intrazellulär gebildeter Moleküle an die Zelloberfläche vermittelt. Die Tatsache, dass dieser synergistische Effekt der Kombinationsexposition zu TNF- α und IFN- γ auf die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-II-Molekülen unter Inhibition von Makroautophagie reversibel ist, legt einen funktionellen Zusammenhang zwischen TNF- α -mediierter Hochregulation von Makroautophagie und MHC-Klasse-II-Expression in den untersuchten Skelettmuskelzellen nahe. Es ist denkbar, dass TNF- α via Induktion von Makroautophagie den Grad an MHC-Klasse-II-Expression in Skelettmuskelzellen über die Beförderung autophagosomalen Inhalts zu MHCs regulieren hilft, um eine effiziente lokale Antigen-Präsentation gegenüber CD4⁺-T-Zellen zu gewährleisten.

Durch den Nachweis APP- und β -Amyloid-haltiger Autophagosomen in Muskelfasern von sIBM-Patienten mit konsekutiver Hochregulation von MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen wurde der Makroautophagie bereits eine mögliche Rolle im Pathomechanismus dieser Erkrankung eingeräumt (LÜNEMANN et al. 2007a). Auch die Möglichkeit einer Beteiligung von Antigen-Präsentation durch Muskelfasern an der Entstehung bzw. Unterhaltung der

Erkrankung wird diskutiert (SCHMIDT et al. 2004). Unterstützend zu den in dieser Arbeit gezeigten Daten konnte mittels immunhistochemischer *ex-vivo*-Analyse in Muskelbiopsien von sIBM-Patienten nachgewiesen werden, dass 20 % der Autophagosomen enthaltenden Muskelfasern auch ein positives Signal für MHC-Klasse-II-Moleküle zeigten. Mehr als 40 % dieser doppelt-positiven Muskelfasern hatten außerdem Kontakt zu CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. Unter den CD4⁺-T-Zellen zeigten zusätzlich mehr als 56 % ein positives Signal für den T-Zell-Aktivierungsmarker CD3 (KELLER et al. 2011). Zwar setzen sich die inflammatorischen Infiltrate im Muskel der sIBM hauptsächlich aus CD8⁺-T-Zellen zusammen. Allerdings wurde bereits mehrfach auf eine mögliche Beteiligung CD4⁺-T-Zellen hingewiesen. So konnte diese Subpopulation von Immunzellen nicht nur in den entzündlichen Infiltraten nachgewiesen werden, sondern darüber hinaus auch gezeigt werden, dass diese Zellen in der sIBM klonal expandieren (ENGEL und ARAHATA 1984, PANDYA et al. 2010, SCHMIDT et al. 2004). Da Makroautophagie vor allem die MHC-Klasse-II-Präsentation von Antigenen intrazellulären Ursprungs unterstützt (DENGJEL et al. 2005), darf die Vermutung geäußert werden, dass TNF- α -vermittelte Induktion von Makroautophagie und die damit einhergehende Hochregulation von MHC-Klasse-II-Molekülen möglicherweise eine lokale CD4⁺-T-Zell-mediierte Autoantigen-Präsentation im Muskel der sIBM unterhält. Der hier vorgeschlagene funktionelle Zusammenhang zwischen Zytokin-vermittelter Induktion von Makroautophagie und konsekutiver Antigen-Präsentation muss nicht zwangsläufig spezifisch für die sIBM anzunehmen sein, sondern könnte vielmehr auch bei anderen inflammatorischen Myopathien wie beispielsweise der Polymyositis eine Rolle spielen. So kommt es auch im Rahmen der Polymyositis zu einer T-Zell-vermittelten Affektion von Muskelfasern vor dem Hintergrund eines anzunehmenden Autoimmungeschehens (DALAKAS 2006).

5.6 Modulation der Degradation von APP und β -Amyloid durch TNF- α -medierte Induktion von Makroautophagie

Neben den bereits beschriebenen entzündlichen Veränderungen stellen degenerative Prozesse ein wesentliches Charakteristikum der sIBM dar. Als wichtigste Komponente der namensgebenden Einschlusskörper konnte eine Überexpression von APP mit konsekutiver intrazellulärer Akkumulation von dessen Spaltprodukt β -Amyloid identifiziert werden, welche zusammen mit anderen aberranten Degenerationsmolekülen die sIBM als myodegenerative Erkrankung ausweisen (ASKANAS und ENGEL 2006, MENDELL et al. 1991). Nachdem kürzlich gezeigt werden konnte, dass APP mit LC3⁺-Vesikeln in Muskelzellen kolokalisiert und β -Amyloid als Substrat der lysosomalen Degradation durch Makroautophagie in der sIBM in Frage kommt (LÜNEMANN et al. 2007b), sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob TNF- α -vermittelte Induktion von Makroautophagie zu einer Modulation von APP und β -

Amyloid im Skelettmuskel führt. Die Exposition von Myoblasten zu TNF- α in einer Konzentration, unter welcher zuvor Makroautophagie suffizient induziert werden konnte, zeigte eine Überexpression von APP im Western Blot. Diese war vergleichbar mit der Hochregulation von APP nach Inkubation der Myoblasten mit dem Makroautophagie-Induktor Rapamycin. Zusätzlich führte die Exposition von Myoblasten zu TNF- α auch zu einer Akkumulation von β -Amyloid im Western Blot sowie in einer immunzytochemischen Analyse zu einem erhöhten Signal für ThioflavinS, welches zum Nachweis von Aggregaten aus β -Faltblattanordnungen eingesetzt wird. Der unter TNF- α -Inkubation erhöhte Nachweis von Aggregaten in der ThioflavinS-Färbung war unter Inhibition von Makroautophagie durch 3-MA und ATG12-spezifischer siRNA reversibel. Diese Ergebnisse veranlassen zu der Annahme, dass TNF- α -vermittelte Induktion von Makroautophagie zu einem vermehrten Auftreten von β -Amyloid-Aggregaten in Muskelzellen führt und dieser Mechanismus auch im Rahmen der Pathogenese der sIBM von Bedeutung sein könnte.

Obwohl die genauen Mechanismen im Einzelnen nicht vollständig geklärt sind, konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass Zytokine und Wachstumsfaktoren zu einer Überexpression von APP in verschiedenen Zelltypen führen können. Im Rahmen des Morbus Alzheimer beispielsweise kommt es neben den klassischen morphologischen Charakteristika vor allem in sehr frühen Stadien zu einer Hochregulation von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , MCP-1 und IP-10. Es ist denkbar, dass diese Moleküle in diesem frühen Stadium als regulatorische Faktoren die Suszeptibilität gegenüber den degenerativen Veränderungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten erhöhen (GALIMBERTI und SCARPINI 2011). Darüberhinaus wurde nachgewiesen, dass TGF- β in humanen Astrozyten zu einer Hochregulation von APP und Anhäufung von β -Amyloid führt und in der Folge möglicherweise indirekt der β -Amyloid-Deposition im Rahmen des Morbus Alzheimer zuträglich ist. TGF- β kolokalisierte hierbei auch mit β -Amyloid-Plaques (BURTON et al. 2002). Auch APP- und TGF- β -überexprimierende transgene Mäuse zeigten vermehrte zerebrale und zerebrovaskuläre Deposition von β -Amyloid (ONGALI et al. 2010).

Interessanterweise konnte in mesangialen Zellen auch eine TGF- β -vermittelte Induktion von Makroautophagie gezeigt werden (DING et al. 2010), was eine funktionelle Verbindung zwischen Zytokin-vermittelter Regulation von Makroautophagie und Anhäufung von Degenerationsmolekülen nahelegt. Anhand eines APP-überexprimierenden Mausmodells konnte ferner veranschaulicht werden, dass IFN- γ und TNF- α zu einer vermehrten Anhäufung von β -Amyloid-Aggregaten in den Gehirnen dieser transgenen Mäuse führte und ein direkter Zusammenhang zwischen proinflammatorischem Zellstress und der Anhäufung aberranter Moleküle in degenerativen Erkrankungen besteht (YAMAMOTO et al. 2007). Dass vor allem TNF- α auch als Regulator von Autophagie eine wesentliche Bedeutung in

verschiedenen Zelltypen zukommt, konnte schon mehrfach belegt werden (BAREGAMIAN et al. 2009, DJAVAHERI-MERGNY et al. 2006, MIZUSHIMA und KLIONSKY 2007).

Die Grauwert-Analysen der ThioflavinS-Färbungen dieser Arbeit zeigen neben einer TNF- α -vermittelten Zunahme des ThioflavinS-Signals einen Verlust dieses Effekts sowie eine grundsätzliche Abnahme des ThioflavinS-Signals unter Ausschaltung von Makroautophagie. Dieses war sowohl unter pharmakologischer als auch siRNA-vermittelter Inhibition zu beobachten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine positive Korrelation zwischen TNF- α -vermittelter autophagischer Aktivität und der Menge an β -Amyloid bzw. dessen Aggregation in humanen Myoblasten besteht. Es erscheint zunächst überraschend, dass die Menge an extra- sowie intrazellulärem β -Amyloid und dessen Aggregaten unter Inhibition des Degradationsprozesses Autophagie abnimmt. In der Vergangenheit wurde bereits die Möglichkeit diskutiert, dass Makroautophagie eine unmittelbare Rolle bei der Produktion von β -Amyloid zukommt (YU WH et al. 2004). In einer Fibroblasten-ähnlichen Zelllinie konnte beispielsweise ein direkter Zusammenhang zwischen Modulation von Makroautophagie und β -Amyloid-Produktion nachgewiesen werden. Hierbei führte sowohl die Inhibition von mTOR als auch die Deprivation von Aminosäuren zu einer Induktion von Makroautophagie. Diese Hochregulation führte in der Folge zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären β -Amyloid-Menge sowie einer Steigerung der β -Amyloid-Sekretion gegenüber den Kontrollen. Umgekehrt führte die Inhibition von Makroautophagie mittels 3-MA zu einer deutlichen Reduktion von β -Amyloid in diesen Zellen, was den Verdacht eines funktionellen Zusammenhangs zwischen autophagischer Aktivität und der Generierung dieses Peptids erhärtet. Diese Ergebnisse werden weiterhin unterstützt durch den Nachweis der γ -Sekretase-Komponenten PS1 und Nicastrin in autophagosomalen Membranen der Neuronen von Alzheimer-Patienten sowie in verschiedenen Zellkulturmodellen und weisen das Autophagosom als β -Amyloid-generierendes Kompartiment aus (YU WH et al. 2005). Es ist daher naheliegend anzunehmen, dass persistierende bzw. inkomplette autophagische Degradation einer exzessiven β -Amyloid-Produktion und konsekutiver Oligomer-Bildung zuträglich sind, zumal das saure Milieu lysosomaler und Lysosomen-ähnlicher Organellen diese β -Amyloid-Oligomer-Bildung substantiell befördern (VASSAR und CITRON 2000). Es wird angenommen, dass β -Amyloid an mehreren Orten innerhalb der Zelle generiert werden kann. So wurden diesbezüglich bereits Endosomen, das ER und der Golgi-Apparat als mögliche Entstehungsorte dieses Peptids identifiziert (CATALDO et al. 2004). Dieses würde erklären, warum selbst unter Inhibition von Makroautophagie trotz Reduktion der β -Amyloid-Produktion noch immer eine detektierbare Bildung des Peptids stattfindet, da autophagosomale Generierung des Moleküls nur einen von mehreren möglichen Entstehungswegen darstellt.

Der genaue Ursprung der dem kompletten Autophagosom vorausgehenden Isolationsmembran ist noch nicht bekannt. Neben mitochondrialen Strukturen werden vesikuläre Membranbestandteile des ERs und des Golgi-Apparates verdächtig, an der Bildung dieser autophagosomalen Vorläufermembran beteiligt zu sein. Ferner ist bekannt, dass sowohl APP als auch der γ -Sekretase-Komplex in Membranen des ERs und des Golgi-Apparates vorhanden sind. Es ist daher denkbar, dass diese beiden Strukturen nicht nur als mögliche Zielstrukturen von Autophagosomen umschlossen werden, sondern vielmehr strukturelle Bestandteile dieser Zellorganellen sind (MIZUSHIMA 2005). Dies wäre auch konsistent mit den Ergebnisse dieser Arbeit im Hinblick auf die Hochregulation von APP unter TNF- α - sowie Rapamycin-vermittelter Induktion von Makroautophagie, zumal unter Inhibition lysosomaler Azidifikation durch Chloroquin das APP-Signal im Western Blot noch stärker hochreguliert werden konnte. Dieses legt nahe, dass die Akkumulation von Autophagosomen zu einem stärkeren Signal des APP führte und analog war zu dem Markerprotein LC3 als integralem Bestandteil der autophagosomalen Membran. Dadurch wird die Vermutung unterstützt, dass APP struktureller Bestandteil von Autophagosomen sein könnte.

Neuronale Induktion von Makroautophagie in einem Alzheimer-Maus-Modell, welches sich APP- und PS1-doppelt-transgener Mäuse bedient, ist ein frühes Phänomen im Krankheitsverlauf und manifestiert sich noch vor der charakteristischen Akkumulation von β -Amyloid-Aggregaten (YU WH et al. 2005). Darüberhinaus zählt auch die Hochregulation proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise TNF- α , MCP-1 und IP-10 zu den frühen Veränderungen im Rahmen einer Alzheimer-Erkrankung (GALIMBERTI und SCARPINI 2011). Aufgrund der gegebenen Ähnlichkeit der vorhandenen degenerativen Veränderungen in der sIBM und der Alzheimer-Erkrankung ist es denkbar, dass analog zu dem proklamierten Pathomechanismus der Alzheimer-Erkrankung im Verlauf der sIBM eine frühe Zytokin-vermittelte Hochregulation von Makroautophagie zu exzessiver Produktion von β -Amyloid führt und Makroautophagie somit ein wichtiges Bindeglied zwischen inflammatorischen und degenerativen Pathomechanismen in der sIBM darstellt.

5.7 Schlussfolgerung

Zusammengenommen zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass Makroautophagie ein in humanen Myoblasten konstitutiv aktiver Prozess ist, welcher über das proinflammatorische Zytokin TNF- α induziert werden kann. Darüberhinaus konnte dargestellt werden, dass TNF- α in Kombination mit IFN- γ einen synergistischen Effekt bezüglich der MHC-Klasse-II-Oberflächenexpression aufweist. Dieser Effekt war abhängig von makroautophagischer Aktivität in den untersuchten Myoblasten und lässt den Schluss zu, dass TNF- α über Regulation von Makroautophagie an der Antigenpräsentation über MHC-

Klasse-II-Moleküle beteiligt ist. Weiterhin konnte in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen TNF- α -vermittelter Induktion von Makroautophagie und Hochregulation von APP sowie vermehrtem Auftreten von β -Amyloid-Aggregaten in humanen Myoblasten belegt werden. Die unter Inhibition von Makroautophagie beobachtete Reduktion der Aggregate unterstützt die Vermutung, dass Autophagosomen möglicherweise aktiv an der Generierung von β -Amyloid beteiligt sind.

Wenngleich vergangene Studien bereits die Wirksamkeit TNF- α -blockierender Antikörper in der Behandlung der sIBM untersucht haben, ist die Datenlage hierzu unbefriedigend. Eine Pilotstudie mit dem TNF- α -Fusionsprotein Etanercept zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Behandlung und Kontrollgruppe nach sechs Monaten. Jedoch war nach zwölf Monaten eine geringe aber signifikante klinische Verbesserung hinsichtlich der Muskelkraft des Handgriffs zu beobachten (BAROHN et al. 2006). Es ist vorstellbar, dass TNF- α vor allem in einem sehr frühen, klinisch noch unauffälligen Stadium der Erkrankung eine Rolle zukommt und unter anderem über die Induktion von Makroautophagie sowohl eine konsekutive Immunantwort als auch charakteristische degenerative Veränderungen in Skelettmuskelfasern der sIBM unterhält bzw. initialisiert. Dieses würde ein mangelndes Ansprechen einer gegen TNF- α gerichteten Therapie zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt erklären, da die über das Zytokin vermittelten pathologischen Veränderungen sich bereits in einem irreversiblen Stadium befinden.

Die vorliegenden Daten legen einen funktionellen Zusammenhang zwischen TNF- α -mediierter Regulation von Makroautophagie, Antigenpräsentation und Akkumulation aberranter Moleküle in Myoblasten nahe und identifizieren sowohl das proinflammatorische Zytokin TNF- α als auch den Zellstoffwechselweg Makroautophagie als mögliche Ziele neuer therapeutischer Strategien in der Behandlung der sIBM.

6. Zusammenfassung

Die sporadische Einschlusskörpermyositis (engl. *sporadic inclusion body myositis*, Abk. sIBM) ist eine chronisch-progrediente entzündliche Muskelerkrankung, die neben der Polymyositis, der Dermatomyositis und der nekrotisierenden Myopathie zu den inflammatorischen Myopathien gehört.

Derzeit steht keine effektive Behandlung der sIBM zur Verfügung. Das komplizierte Zusammenspiel der verschiedenen Pathomechanismen der sIBM ist bisher nur unzureichend verstanden. Die Hauptmerkmale dieser komplexen Muskelerkrankung sind das gleichzeitige Vorliegen entzündlicher sowie degenerativer Prozesse innerhalb des Muskels. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Interaktionen proinflammatorischer Zytokine, MHC-Expression, Makroautophagie und Akkumulation von APP bzw. β -Amyloid im humanen Skelettmuskel untersucht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Makroautophagie ein in humanen Myoblasten konstitutiv aktiver Prozess ist, welcher in Anwesenheit des Makrolids Rapamycin induziert werden kann. Weiterhin konnte unter einer Vielzahl proinflammatorischer Moleküle das Zytokin TNF- α als Induktor von Makroautophagie identifiziert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen außerdem, dass Makroautophagie in Skelettmuskelzellen durch TNF- α induziert werden kann, diese Zellen resistent gegenüber TNF-R-vermitteltem Zelltod sind und Makroautophagie die Empfindlichkeit gegenüber TNF-R-vermittelter Apoptose nicht beeinflusst. Ferner konnte dargestellt werden, dass TNF- α in Kombination mit IFN- γ einen synergistischen Effekt bezüglich der MHC-Klasse-II-Oberflächenexpression aufweist. Dieser Effekt war abhängig von makroautophagischer Aktivität in den untersuchten Myoblasten und lässt den Schluss zu, dass TNF- α über Regulation von Makroautophagie an der Antigenpräsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle beteiligt ist. Schließlich konnte in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen TNF- α -vermittelter Induktion von Makroautophagie und Hochregulation von APP sowie vermehrtem Auftreten von β -Amyloid-Aggregaten in humanen Myoblasten belegt werden. Die unter Inhibition von Makroautophagie beobachtete Reduktion der Aggregate unterstützt die Vermutung, dass Autophagosomen möglicherweise aktiv an der Generierung von β -Amyloid im Muskel beteiligt sind.

Die hier dargestellten Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis der Interaktionen zwischen proinflammatorischen Zytokinen, makroautophagischer Aktivität, sowie MHC-Klasse-II-Expression und Akkumulation aberranter Moleküle in Muskelzellen als Mechanismus autoimmun-entzündlicher Muskelerkrankungen bei und können somit helfen, neue Therapiestrategien zu entwickeln.

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.1-1	Analyse von LC3 ⁺ -Vesikeln in An- und Abwesenheit von CQ mittels Konfokalmikroskopie	51
Abbildung 4.1-2	Inhibition von Makroautophagie mittels ATG12-spezifischer siRNA	53
Abbildung 4.2-1	Hochregulation von Makroautophagie in Myoblasten durch Inhibition von mTOR mittels Rapamycin	53
Abbildung 4.3-1	Analyse autophagosomaler Aktivität in CCL136-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Überständen aus aktivierten T-Zell-Kulturen bzw. aus Kulturen Monozyten-abgeleiteter maturierter DCs in An- und Abwesenheit von CQ	55
Abbildung 4.3.2-1	Immunoblot-Detektion der LC3-II-Expression in Myoblasten nach 24-stündiger Exposition gegenüber inflammatorischer Moleküle in Konzentrationen gemäß vorheriger Luminex-Analyse	56
Abbildung 4.3.2-2	Analyse der LC3-Expression nach Inkubation mit TNF- α in An- und Abwesenheit von CQ mittels Konfokalmikroskopie	58
Abbildung 4.3.2-3	TNF- α -medierte Induktion von Makroautophagie im Immunoblot ist kein ubiquitär zu beobachtender Effekt	59
Abbildung 4.4-1	Analyse der apoptotischen Zelltodrate in Myoblasten über die Detektion der DNA-Fragmentation mittels Durchflusszytometrie	60
Abbildung 4.4-2	Modulation von Makroautophagie verändert nicht die Suszeptibilität gegenüber TNF- α -induzierter Apoptose in humanen Myoblasten der CCL136-Zelllinie	61
Abbildung 4.5-1	Durchflusszytometrische Bestimmung von MHC-Klasse-I-Oberflächenmarkern	63
Abbildung 4.5-2	Durchflusszytometrische Bestimmung von MHC-Klasse-II-Oberflächenmarkern	64
Abbildung 4.5-3	Durchflusszytometrische Untersuchung des synergistischen Effekts von TNF- α und IFN- γ auf die MHC-Klasse-II-Regulation	65
Abbildung 4.5-4	Durchflusszytometrische Untersuchung des synergistischen Effekts von TNF- α und IFN- γ auf die MHC-Klasse-II-Regulation in An- und Abwesenheit des spezifischen Makroautophagie-Inhibitors 3-MA	66
Abbildung 4.6-1	Erhöhte Akkumulation von APP durch Inkubation von Myoblasten mit TNF- α und Rapamycin im Immunoblot	67
Abbildung 4.6-2	Erhöhte Akkumulation von APP-Spaltprodukten durch Inkubation von Myoblasten mit TNF- α im Immunoblot	68

Abbildung 4.6-3	Immunfluoreszenter Nachweis von β -Amyloid-Aggregaten mittels ThioflavinS-Färbung in Myoblasten nach Inkubation mit TNF- α	69
Abbildung 4.6-4	Nachweis von β -Amyloid-Aggregaten mittels ThioflavinS-Färbung in Myoblasten nach Inkubation mit TNF- α unter Inhibition von Makroautophagie mittels ATG12-spezifischer siRNA sowie des pharmakologischen Inhibitors 3-MA	70

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1-1	Liste verwendeter Labormaterialien	20
Tabelle 2.2-1	Liste verwendeter Geräte	21
Tabelle 2.3-1	Liste verwendeter Chemikalien	22
Tabelle 2.4-1	Liste verwendeter Puffer mit Rezeptur	25
Tabelle 2.5-1	Liste verwendeter Medien	26
Tabelle 2.6-1	Liste verwendeter Antikörper und Farbstoffe	27
Tabelle 2.7-1	Liste verwendeter siRNA	27
Tabelle 2.8-1	Liste verwendeter Primer Proben	28
Tabelle 2.9-1	Liste verwendeter Antibiotika	28
Tabelle 2.10-1	Liste verwendeter Zytokine	28
Tabelle 2.11-1	Verwendeter Längenstandard und Kits für Immunoblot	29
Tabelle 2.12-1	Verwendete Zellen	29
Tabelle 2.13-1	Verwendete Software	29
Tabelle 3.1.2-1	Verwendete Zellzahl pro Well bzw. Kammer	32
Tabelle 3.1.2-2	Verwendetes Mediumvolumen pro Well bzw. Kammer	32
Tabelle 3.1.8-1	Verwendete Inhibitoren/Induktoren für <i>in-vitro</i> -Experimente	34
Tabelle 3.2.1.5-1	Farbstoffe, die für immunzytochemische Untersuchungen verwendet wurden sowie deren entsprechende Filter	36
Tabelle 3.2.1.5-2	Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten für die Immunzytochemie	36
Tabelle 3.2.2.3-1	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels	39
Tabelle 3.2.2.4-1	Aufbau der Transferkammer	40
Tabelle 3.2.2.6-1	Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten für den Proteinnachweis auf Nitrozellulosemembranen	41
Tabelle 3.2.2.7-1	Immundetektion von β -Aktin nach Strippen der Nitrozellulosemembran	42
Tabelle 3.3.1-1	Verhältnis zwischen ATG12-siRNA und Nanofektin beim Einsatz in 24-Well-Platten	46
Tabelle 3.3.2.3-1	Erster Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese	47

Tabelle 3.3.2.3-2	Zweiter Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese	48
Tabelle 3.3.2.4-1	Hauptmix der quantitativen Real Time-PCR	49
Tabelle 3.3.2.4-2	Konditionen der Real Time-PCR	49
Tabelle 3.3.2.4-3	Verwendete Primer-Proben	49
Tabelle 4.3.1-1	Quantifikation inflammatorischer Moleküle in Überständen aus der Kultur Monozyten- abgeleiteter maturierter dendritischer Zellen	55

8. Literaturverzeichnis

- AMATO AA, SHEBERT RT (1998): Inclusion body myositis in twins. *Neurology* 51, 598-600
- AMATO AA, BAROHN RJ (2009): Inclusion body myositis: old and new concepts. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80, 1186-1193
- AMATO AA, BAROHN RJ, JACKSON CE, PAPPERT EJ, SAHENK Z, KISSEL JT (1994): Inclusion body myositis: treatment with intravenous immunoglobulin. *Neurology* 44, 1516-1518
- AMATO AA, GRONSETH GS, JACKSON CE, WOLFE GI, KATZ JS, BRYAN WW, BAROHN RJ (1996): Inclusion body myositis: clinical and pathological boundaries. *Ann Neurol* 40, 581-586
- ANDRADE RM, WESSENDARP M, GUBBELS MJ, STRIEPEN B, SUBAUSTE CS (2006): CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J Clin Invest* 116, 2366-2377
- ARAHATA K, ENGEL AG (1986): Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. III: Immunoelectron microscopy aspects of cell-mediated muscle fiber injury. *Ann Neurol* 19, 112-125
- ARANCIBIA-CARCAMO CV, OSAWA H, ARNETT HA, HASKOVA Z, GEORGE AJ, ONO SJ, TING JP, STREILEIN JW (2004): A CIITA-independent pathway that promotes expression of endogenous rather than exogenous peptides in immune-privileged sites. *Eur J Immunol* 34, 471-480
- ARENDS MJ, MORRIS RG, WYLLIE AH (1990): Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136, 593-608
- ARGOV Z, EISENBERG I, MITRANI-ROSENBAUM S (1998): Genetics of inclusion body myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 10, 543-547
- ARNARDOTTIR S, BORG K, ANSVED T (2004): Sporadic inclusion body myositis: morphology, regeneration, and cytoskeletal structure of muscle fibres. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 917-920
- ASKANAS V, ENGEL WK (1993): New advances in inclusion-body myositis. *Curr Opin Rheumatol* 5, 732-741
- ASKANAS V, ENGEL WK (2001): Inclusion-body myositis: newest concepts of pathogenesis and relation to aging and Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 1-14
- ASKANAS V, ENGEL WK (2003): Proposed pathogenetic cascade of inclusion-body myositis: importance of amyloid-beta, misfolded proteins, predisposing genes, and aging. *Curr Opin Rheumatol* 15, 737-744
- ASKANAS V, ENGEL WK (2006): Inclusion-body myositis: a myodegenerative conformational disorder associated with A β , protein misfolding, and proteasome inhibition. *Neurology* 66, S39-48
- ASKANAS V, ENGEL WK, ALVAREZ RB, GLENNER GG (1992): beta-Amyloid protein immunoreactivity in muscle of patients with inclusion-body myositis. *Lancet* 339, 560-561
- 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, 177-187
- ASKANAS V, McFERRIN J, BAQUE 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, 1314-1319
- ASKANAS V, McFERRIN J, ALVAREZ RB, BAQUE S, ENGEL WK (1997): Beta APP gene transfer into cultured human muscle induces inclusion-body myositis aspects. *Neuroreport* 8, 2155-2158
- ASKANAS V, ENGEL WK, ALVAREZ RB, McFERRIN J, BROCCOLINI A (2000): Novel immunolocalization of alpha-synuclein in human muscle of inclusion-body myositis, regenerating and necrotic muscle fibers, and at neuromuscular junctions. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 592-598
- BADRISING UA, SCHREUDER GM, GIPHART MJ, GELEIJNS K, VERSCHUUREN JJ, WINTZEN AR, MAAT-SCHIEMAN ML, VAN DOORN P, VAN ENGELEN BG, FABER CG (2004): Associations with autoimmune disorders and HLA class I and II antigens in inclusion body myositis. *Neurology* 63, 2396-2398

- BANCHEREAU J, STEINMAN RM (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252
- BANWELL BL, ENGEL AG (2000): AlphaB-crystallin immunolocalization yields new insights into inclusion body myositis. *Neurology* 54, 1033-1041
- BAREGAMIAN N, SONG J, BAILEY CE, PAPACONSTANTINO J, EVERS BM, CHUNG DH (2009): Tumor necrosis factor-alpha and apoptosis signal-regulating kinase 1 control reactive oxygen species release, mitochondrial autophagy, and c-Jun N-terminal kinase/p38 phosphorylation during necrotizing enterocolitis. *Oxid Med Cell Longev* 2, 297-306
- BAROHN RJ, HERBELIN L, KISSEL JT, KING W, MCVEY AL, SAPERSTEIN DS, MENDELL JR (2006): Pilot trial of etanercept in the treatment of inclusion-body myositis. *Neurology* 66, S123-124
- BEKPEN C, HUNN JP, ROHDE C, PARVANOVA I, GUETHLEIN L, DUNN DM, GLOWALLA E, LEPTIN M, HOWARD JC (2005): The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol* 6, R92
- BEYENBURG S, ZIERZ S, JERUSALEM F (1994): Einschlusskörpermyositis. *Act Neurol* 21, 77-83
- BLOMMAART EF, KRAUSE U, SCHELLENS JP, VREELING-SINDELAROVA H, MEIJER AJ (1997): The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 243, 240-246
- BRADFORD MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- BRADSHAW EM, ORIHUELA A, MCADEL SL, SALAJEGHEH M, AMATO AA, HAFNER DA, GREENBERG SA, O'CONNOR KC (2007): A local antigen-driven humoral response is present in the inflammatory myopathies. *J Immunol* 178, 547-556
- 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, 7713-7720
- BURTON T, LIANG B, DIBROV A, AMARA F (2002): Transforming growth factor-beta-induced transcription of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein gene involves interaction between the CTCF-complex and Smads. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 713-723
- BUSSIERE 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, 987-995
- CATALDO AM, PETANCESKA S, TERIO NB, PETERHOFF CM, DURHAM R, MERCKEN M, MEHTA PD, BUXBAUM J, HAROUTUNIAN V, NIXON RA (2004): Abeta localization in abnormal endosomes: association with earliest Abeta elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol Aging* 25, 1263-1272
- CHOU SM (1967): Myxovirus-like structures in a case of human chronic polymyositis. *Science* 158, 1453-1455
- CIVATTE M, BARTOLI C, SCHLEINIZ N, CHETAILE B, PELLISSIER JF, FIGARELLA-BRANGER D (2005): Expression of the beta chemokines CCL3, CCL4, CCL5 and their receptors in idiopathic inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31, 70-79
- CLARKE PG (1990): Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181, 195-213
- COLE SL, VASSAR R (2007): The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener* 2, 22
- COX FM, DELGADO V, VERSCHUUREN JJ, BALLIEUX BE, BAX JJ, WINTZEN AR, BADRISING UA (2009): The heart in sporadic inclusion body myositis: a study in 51 patients. *J Neurol* 257, 447-451
- CUELLO AC (2005): Intracellular and extracellular Abeta, a tale of two neuropathologies. *Brain Pathol* 15, 66-71
- CUERVO AM, STEFANIS L, FREDENBURG R, LANSBURY PT, SULZER D (2004): Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305, 1292-1295
- CUPLER EJ, LEON-MONZON M, MILLER J, SEMINO-MORA C, ANDERSON TL, DALAKAS MC (1996): Inclusion body myositis in HIV-1 and HTLV-1 infected patients. *Brain* 119 (Pt 6), 1887-1893

- CURNOW J, CORLETT L, WILLCOX N, VINCENT A (2001): Presentation by myoblasts of an epitope from endogenous acetylcholine receptor indicates a potential role in the spreading of the immune response. *J Neuroimmunol* 115, 127-134
- DAHLGREN KN, MANELLI AM, STINE WB, JR., BAKER LK, KRAFFT GA, LADU MJ (2002): Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 277, 32046-32053
- DALAKAS MC (1991): Polymyositis, dermatomyositis and inclusion-body myositis. *N Engl J Med* 325, 1487-1498
- DALAKAS MC (1995): Immunopathogenesis of inflammatory myopathies. *Ann Neurol* 37 Suppl 1, S74-86
- DALAKAS MC (2003): Therapeutic approaches in patients with inflammatory myopathies. *Semin Neurol* 23, 199-206
- DALAKAS MC (2006): Sporadic inclusion body myositis--diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 437-447
- DALAKAS MC (2006): Mechanisms of disease: signaling pathways and immunobiology of inflammatory myopathies. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2, 219-227
- DALAKAS MC (2007): Autoimmune inflammatory myopathies. *Handb Clin Neurol* 86, 273-301
- DALAKAS MC, SIVAKUMAR K (1996): The immunopathologic and inflammatory differences between dermatomyositis, polymyositis and sporadic inclusion body myositis. *Curr Opin Neurol* 9, 235-239
- DALAKAS MC, ILLA I, GALLARDO E, JUAREZ C (1997): Inclusion body myositis and paraproteinemia: incidence and immunopathologic correlations. *Ann Neurol* 41, 100-104
- DALAKAS MC, RAKOCEVIC G, SCHMIDT J, SALAJEGHEH M, MCELROY B, HARRIS-LOVE MO, SHRADER JA, LEVY EW, DAMBROSIA J, KAMPEN RL (2009): Effect of Alemtuzumab (CAMPATH 1-H) in patients with inclusion-body myositis. *Brain* 132, 1536-1544
- DE BLEECKER JL, MEIRE VI, DECLERCQ W, VAN AKEN EH (1999): Immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha and its receptors in inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord* 9, 239-246
- DE BLEECKER JL, DE PAEPE B, VANWALLEGHEM IE, SCHRODER JM (2002): Differential expression of chemokines in inflammatory myopathies. *Neurology* 58, 1779-1785
- DENGJEL J, SCHOOR O, FISCHER R, REICH M, KRAUS M, MULLER M, KREYMBORG K, ALTENBEREND F, BRANDENBURG J, KALBACHER H (2005): Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7922-7927
- DE STROOPER B, ANNAERT W (2000): Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113 (Pt 11), 1857-1870
- DING Y, KIM JK, KIM SI, NA HJ, JUN SY, LEE SJ, CHOI ME (2010): TGF- β 1 protects against mesangial cell apoptosis via induction of autophagy. *J Biol Chem* 285, 37909-37919
- DJAVAHERI-MERGNY M, AMELOTTI M, MATHIEU J, BESANCON F, BAUVY C, SOUQUERE S, PIERRON G, CODOGNO P (2006): NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem* 281, 30373-30382
- DORFEL D, APPEL S, GRUNEBACH F, WECK MM, MULLER MR, HEINE A, BROSSART P (2005): Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood* 105, 3199-3205
- ECHEVERRIA V, CUELLO AC (2002): Intracellular A-beta amyloid, a sign for worse things to come? *Mol Neurobiol* 26, 299-316
- EISENBERG I, AVIDAN N, POTIKHA T, HOCHNER H, CHEN M, OLENDER T, BARASH M, SHEMESH M, SADEH M, GRABOV-NARDINI G (2001): The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet* 29, 83-87
- ENGEL AG, ARAHATA K (1984): Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. II: Phenotypes of autoinvasive cells in polymyositis and inclusion body myositis. *Ann Neurol* 16, 209-215
- FERRER I, CARMONA M, BLANCO R, MORENO D, TORREJON-ESCRIBANO B, OLIVE M (2005): Involvement of clusterin and the aggresome in abnormal protein deposits in myofibrillar myopathies and inclusion body myositis. *Brain Pathol* 15, 101-108

- FIGARELLA-BRANGER D, NEDELEC J, PELLISSIER JF, BOUCRAUT J, BIANCO N, ROUGON G (1990): Expression of various isoforms of neural cell adhesive molecules and their highly polysialylated counterparts in diseased human muscles. *J Neurol Sci* 98, 21-36
- FIGARELLA-BRANGER D, CIVATTE M, BARTOLI C, PELLISSIER JF (2003): Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 28, 659-682
- FORLONI G, TERRENI L, BERTANI I, FOGLIARINO S, INVERNIZZI R, ASSINI A, RIBIZZI G, NEGRO A, CALABRESE E, VOLONTE MA (2002): Protein misfolding in Alzheimer's and Parkinson's disease: genetics and molecular mechanisms. *Neurobiol Aging* 23, 957-976
- FRATTA P, ENGEL WK, MCFERRIN J, DAVIES KJ, LIN SW, ASKANAS V (2005): Proteasome inhibition and aggresome formation in sporadic inclusion-body myositis and in amyloid-beta precursor protein-overexpressing cultured human muscle fibers. *Am J Pathol* 167, 517-526
- FYHR IM, LINDBERG C, OLDFORS A (2002): Expression of Bcl-2 in inclusion body myositis. *Acta Neurol Scand* 105, 403-407
- GALIMBERTI D, SCARPINI E (2011): Inflammation and oxidative damage in Alzheimer's disease: friend or foe? *Front Biosci (Schol Ed)* 3, 252-266
- GOEBELS N, MICHAELIS D, WEKERLE H, HOHLFELD R (1992): Human myoblasts as antigen-presenting cells. *J Immunol* 149, 661-667
- GOURAS GK, TSAI J, NASLUND J, VINCENT B, EDGAR M, CHECLER F, GREENFIELD JP, HAROUTUNIAN V, BUXBAUM JD, XU H (2000): Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 156, 15-20
- GREENBERG SA, SANODOU D, HASLETT JN, KOHANE IS, KUNKEL LM, BEGGS AH, AMATO AA (2002): Molecular profiles of inflammatory myopathies. *Neurology* 59, 1170-1182
- GREENBERG SA, BRADSHAW EM, PINKUS JL, PINKUS GS, BURLESON T, DUE B, BREGOLI L, O'CONNOR KC, AMATO AA (2005): Plasma cells in muscle in inclusion body myositis and polymyositis. *Neurology* 65, 1782-1787
- GREENBERG SA, PINKUS GS, AMATO AA, PINKUS JL (2007): Myeloid dendritic cells in inclusion-body myositis and polymyositis. *Muscle Nerve* 35, 17-23
- GRIGGS RC, ASKANAS V, DIMAURO S, ENGEL A, KARPATI G, MENDELL JR, ROWLAND LP (1995): Inclusion body myositis and myopathies. *Ann Neurol* 38, 705-713
- GUPTA S (2002): A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J Clin Immunol* 22, 185-194
- GUTIERREZ MG, MASTER SS, SINGH SB, TAYLOR GA, COLOMBO MI, DERETIC V (2004): Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753-766
- HANADA T, OHSUMI Y (2005): Structure-function relationship of Atg12, a ubiquitin-like modifier essential for autophagy. *Autophagy* 1, 110-118
- HARA T, NAKAMURA K, MATSUI M, YAMAMOTO A, NAKAHARA Y, SUZUKI-MIGISHIMA R, YOKOYAMA M, MISHIMA K, SAITO I, OKANO H (2006): Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-889
- HARRIS J, DE HARO SA, MASTER SS, KEANE J, ROBERTS EA, DELGADO M, DERETIC V (2007): T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Immunity* 27, 505-517
- HOHLFELD R, ENGEL AG (1994): The immunobiology of muscle. *Immunol Today* 15, 269-274
- HOHLFELD R, DORNMAIR K (2007): Revisiting the immunopathogenesis of the inflammatory myopathies. *Neurology* 69, 1966-1967
- HONG HS, HWANG EM, SIM HJ, CHO HJ, BOO JH, OH SS, KIM SU, MOOK-JUNG I (2003): Interferon gamma stimulates beta-secretase expression and sAPPbeta production in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 307, 922-927
- HORNUNG JP, KOPPEL H, CLARKE PG (1989): Endocytosis and autophagy in dying neurons: an ultrastructural study in chick embryos. *J Comp Neurol* 283, 425-437

- HUANG J, KLIONSKY DJ (2007): Autophagy and human disease. *Cell Cycle* 6, 1837-1849
- HUSSAIN I, POWELL DJ, HOWLETT DR, CHAPMAN GA, GILMOUR L, MURDOCK PR, TEW DG, MEEK TD, CHAPMAN C, SCHNEIDER K (2000): ASP1 (BACE2) cleaves the amyloid precursor protein at the beta-secretase site. *Mol Cell Neurosci* 16, 609-619
- HUTLOFF A, DITTRICH AM, BEIER KC, ELJASCHEWITSCH B, KRAFT R, ANAGNOSTOPOULOS I, KROCZEK RA (1999): ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266
- IKEZOE K, OHSHIMA S, OSOEGAWA M, TANAKA M, OGAWA K, NAGATA K, KIRA JI (2006): Expression of granulysin in polymyositis and inclusion-body myositis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 1187-1190
- JIN LW, HEARN MG, OGBURN CE, DANG N, NOCHLIN D, LADIGES WC, MARTIN GM (1998): Transgenic mice over-expressing the C-99 fragment of betaPP with an alpha-secretase site mutation develop a myopathy similar to human inclusion body myositis. *Am J Pathol* 153, 1679-1686
- KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, YAMAMOTO A, KIRISAKO T, NODA T, KOMINAMI E, OHSUMI Y, YOSHIMORI T (2000): LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19, 5720-5728
- KABEYA Y, KAWAMATA T, SUZUKI K, OHSUMI Y (2007): Cis1/Atg31 is required for autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 356, 405-410
- KAMADA Y, FUNAKOSHI T, SHINTANI T, NAGANO K, OHSUMI M, OHSUMI Y (2000): Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150, 1507-1513
- KEGEL KB, KIM M, SAPP E, MCINTYRE C, CASTANO JG, ARONIN N, DIFIGLIA M (2000): Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci* 20, 7268-7278
- KELLER CW, FOKKEN C, TURVILLE SG, LUNEMANN A, SCHMIDT J, MUNZ C, LUNEMANN JD (2011): TNF-alpha induces macroautophagy and regulates MHC class II expression in human skeletal muscle cells. *J Biol Chem*
- KIHARA A, NODA T, ISHIHARA N, OHSUMI Y (2001): Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 152, 519-530
- KIM J, HUANG WP, KLIONSKY DJ (2001): Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. *J Cell Biol* 152, 51-64
- KITAZAWA M, GREEN KN, CACCAMO A, LAFERLA FM (2006): Genetically augmenting Abeta42 levels in skeletal muscle exacerbates inclusion body myositis-like pathology and motor deficits in transgenic mice. *Am J Pathol* 168, 1986-1997
- KLIONSKY DJ, MEIJER AJ, CODOGNO P (2005): Autophagy and p70S6 kinase. *Autophagy* 1, 59-60; discussion 60-51
- KLIONSKY DJ (2007): Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 931-937
- KOFFMAN BM, RUGIERO M, DALAKAS MC (1998a): Immune-mediated conditions and antibodies associated with sporadic inclusion body myositis. *Muscle Nerve* 21, 115-117
- KOFFMAN BM, SIVAKUMAR K, SIMONIS T, STRONCEK D, DALAKAS MC (1998b): HLA allele distribution distinguishes sporadic inclusion body myositis from hereditary inclusion body myopathies. *J Neuroimmunol* 84, 139-142
- KOIKE M, SHIBATA M, WAGURI S, YOSHIMURA K, TANIDA I, KOMINAMI E, GOTOW T, PETERS C, VON FIGURA K, MIZUSHIMA N (2005): Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* 167, 1713-1728
- KOMATSU M, WAGURI S, UENO T, IWATA J, MURATA S, TANIDA I, EZAKI J, MIZUSHIMA N, OHSUMI Y, UCHIYAMA Y (2005): Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169, 425-434
- KOMATSU M, KOMINAMI E, TANAKA K (2006): Autophagy and neurodegeneration. *Autophagy* 2, 315-317

- KUMAMOTO T, UHEYAMA H, TSUMURA H, TOYOSHIMA I, TSUDA T (2004): Expression of lysosome-related proteins and genes in the skeletal muscles of inclusion body myositis. *Acta Neuropathol* 107, 59-65
- LAM YA, PICKART CM, ALBAN A, LANDON M, JAMIESON C, RAMAGE R, MAYER RJ, LAYFIELD R (2000): Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9902-9906
- LEE CY, BAEHRECKE EH (2001): Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development* 128, 1443-1455
- LEVINE B, KROEMER G (2008): Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42
- 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, 362-370
- LOCKSHIN RA, ZAKERI Z (2004): Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2405-2419
- LUNDBERG I, BRENGMAN JM, ENGEL AG (1995): Analysis of cytokine expression in muscle in inflammatory myopathies, Duchenne dystrophy, and non-weak controls. *J Neuroimmunol* 63, 9-16
- LUNDBERG I, ULFGREN AK, NYBERG P, ANDERSSON U, KLARESKOG L (1997): Cytokine production in muscle tissue of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum* 40, 865-874
- LÜNEMANN JD, SCHMIDT J, DALAKAS MC, MÜNZ C (2007a): Macroautophagy as a pathomechanism in sporadic inclusion body myositis. *Autophagy* 3, 384-386
- LÜNEMANN JD, SCHMIDT J, SCHMID D, BARTHEL K, WREDE A, DALAKAS MC, MÜNZ C (2007b): Beta-amyloid is a substrate of autophagy in sporadic inclusion body myositis. *Ann Neurol* 61, 476-483
- MARTIN DN, BAEHRECKE EH (2004): Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development* 131, 275-284
- MASIERO E, AGATEA L, MAMMUCARI C, BLAAUW B, LORO E, KOMATSU M, METZGER D, REGGIANI C, SCHIAFFINO S, SANDRI M (2009): Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* 10, 507-515
- MASSEY AC, ZHANG C, CUERVO AM (2006): Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* 73, 205-235
- MASTAGLIA FL, NEEDHAM M, SCOTT A, JAMES I, ZILKO P, DAY T, KIERS L, CORBETT A, WITT CS, ALLCOCK R (2009): Sporadic inclusion body myositis: HLA-DRB1 allele interactions influence disease risk and clinical phenotype. *Neuromuscul Disord* 19, 763-765
- MATSUURA A, TSUKADA M, WADA Y, OHSUMI Y (1997): Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 192, 245-250
- McFERRIN J, ENGEL WK, ASKANAS V (1998): Impaired innervation of cultured human muscle overexpressing betaAPP experimentally and genetically: relevance to inclusion-body myopathies. *Neuroreport* 9, 3201-3205
- McFERRIN J, ENGEL WK, ASKANAS V (1999): Cultured inclusion-body myositis muscle fibers do not accumulate beta-amyloid precursor protein and can be innervated. *Neurology* 53, 2184-2187
- 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, 1229-1234
- MICHAELIS D, GOEBELS N, HOHLFELD R (1993): Constitutive and cytokine-induced expression of human leukocyte antigens and cell adhesion molecules by human myotubes. *Am J Pathol* 143, 1142-1149
- MILLS KR, REGINATO M, DEBNATH J, QUEENAN B, BRUGGE JS (2004): Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3438-3443
- 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, 159-163
- MIZUSHIMA N (2005): A(beta) generation in autophagic vacuoles. *J Cell Biol* 171, 15-17
- MIZUSHIMA N (2007): Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21, 2861-2873

- MIZUSHIMA N, KLIONSKY DJ (2007): Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* 27, 19-40
- MIZUSHIMA N, YAMAMOTO A, MATSUI M, YOSHIMORI T, OHSUMI Y (2004): In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15, 1101-1111
- MUNTZING K, LINDBERG C, MOSLEMI AR, OLDFORS A (2003): Inclusion body myositis: clonal expansions of muscle-infiltrating T cells persist over time. *Scand J Immunol* 58, 195-200
- MURPHY MP, GOLDE TE (2006): Inclusion-body myositis and Alzheimer disease: two sides of the same coin, or different currencies altogether? *Neurology* 66, S65-68
- MUTH IE, BARTHEL K, BAHR M, DALAKAS MC, SCHMIDT J (2009): Proinflammatory cell stress in sporadic inclusion body myositis muscle: overexpression of alphaB-crystallin is associated with amyloid precursor protein and accumulation of beta-amyloid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80, 1344-1349
- NAGARAJU K (2005): Role of major histocompatibility complex class I molecules in autoimmune myositis. *Curr Opin Rheumatol* 17, 725-730
- NAGARAJU K, CASCIOLA-ROSEN L, LUNDBERG I, RAWAT R, CUTTING S, THAPLIYAL R, CHANG J, DWIVEDI S, MITSAK M, CHEN YW (2005): Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction. *Arthritis Rheum* 52, 1824-1835
- NEEDHAM M, MASTAGLIA FL (2008): Sporadic inclusion body myositis: a continuing puzzle. *Neuromuscul Disord* 18, 6-16
- NIKCEVICH KM, PISKURICH JF, HELLENDALL RP, WANG Y, TING JP (1999): Differential selectivity of CIITA promoter activation by IFN-gamma and IRF-1 in astrocytes and macrophages: CIITA promoter activation is not affected by TNF-alpha. *J Neuroimmunol* 99, 195-204
- NIMMERJAHN F, MILOSEVIC S, BEHREND S, JAFFEE EM, PARDOLL DM, BORNKAMM GW, MAUTNER J (2003): Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* 33, 1250-1259
- NIXON RA, WEGIEL J, KUMAR A, YU WH, PETERHOFF C, CATALDO A, CUERVO AM (2005): Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 113-122
- NIXON RA (2006): Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? *Trends Neurosci* 29, 528-535
- NUNEZ R (2001): DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol* 3, 67-70
- OLDFORS A, MOSLEMI AR, JONASSON L, OHLSSON M, KOLLBERG G, LINDBERG C (2006): Mitochondrial abnormalities in inclusion-body myositis. *Neurology* 66, S49-55
- ONGALI B, NICOLAKAKIS N, LECRUX C, ABOULKASSIM T, ROSA-NETO P, PAPADOPOULOS P, TONG XK, HAMEL E (2010): Transgenic mice overexpressing APP and transforming growth factor-beta1 feature cognitive and vascular hallmarks of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 177, 3071-3080
- ORVEDAHL A, ALEXANDER D, TALLOCY Z, SUN Q, WEI Y, ZHANG W, BURNS D, LEIB DA, LEVINE B (2007): HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* 1, 23-35
- 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, 474-479
- PALUDAN C, SCHMID D, LANDTHALER M, VOCKERODT M, KUBE D, TUSCHL T, MÜNZ C (2005): Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307, 593-596
- PANDYA JM, FASTH AE, ZONG M, ARNARDOTTIR S, DANI L, LINDROOS E, MALMSTROM V, LUNDBERG IE (2010): Expanded T cell receptor Vbeta-restricted T cells from patients with sporadic inclusion body myositis are proinflammatory and cytotoxic CD28null T cells. *Arthritis Rheum* 62, 3457-3466
- PASQUALI L, RUFFOLI R, FULCERI F, PIETRACUPA S, SICILIANO G, PAPARELLI A, FORNAI F (2010): The role of autophagy: what can be learned from the genetic forms of amyotrophic lateral sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9, 268-278

- PENG A, KOFFMAN BM, MALLEY JD, DALAKAS MC (2000): Disease progression in sporadic inclusion body myositis: observations in 78 patients. *Neurology* 55, 296-298
- PRICE P, SANTOSO L, MASTAGLIA F, GARLEPP M, KOK CC, ALLCOCK R, LAING N (2004): Two major histocompatibility complex haplotypes influence susceptibility to sporadic inclusion body myositis: critical evaluation of an association with HLA-DR3. *Tissue Antigens* 64, 575-580
- QUERFURTH HW, SUHARA T, ROSEN KM, MCPHIE DL, FUJIO Y, TEJADA G, NEVE RL, ADELMAN LS, WALSH K (2001): Beta-amyloid peptide expression is sufficient for myotube death: implications for human inclusion body myopathy. *Mol Cell Neurosci* 17, 793-810
- RABEN N, ROBERTS A, PLOTZ PH (2007): Role of autophagy in the pathogenesis of Pompe disease. *Acta Myol* 26, 45-48
- RAJU R, VASCONCELOS O, GRANGER R, DALAKAS MC (2003): Expression of IFN-gamma-inducible chemokines in inclusion body myositis. *J Neuroimmunol* 141, 125-131
- RAJU R, DALAKAS MC (2005): Gene expression profile in the muscles of patients with inflammatory myopathies: effect of therapy with IVIg and biological validation of clinically relevant genes. *Brain* 128, 1887-1896
- RAVIKUMAR B, VACHER C, BERGER Z, DAVIES JE, LUO S, OROZ LG, SCARAVILLI F, EASTON DF, DUDEN R, O'KANE CJ (2004): Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36, 585-595
- REGGIORI F, KLIONSKY DJ (2005): Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Curr Opin Cell Biol* 17, 415-422
- RICCARDI C, NICOLETTI I (2006): Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1, 1458-1461
- ROSSI M, YOUNG JW (2005): Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 175, 1373-1381
- RUBINSZTEIN DC, GESTWICKI JE, MURPHY LO, KLIONSKY DJ (2007): Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* 6, 304-312
- SARKAR S, FLOTO RA, BERGER Z, IMARISIO S, CORDENIER A, PASCO M, COOK LJ, RUBINSZTEIN DC (2005): Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol* 170, 1101-1111
- SHELLENBERG KL, JOHNSTON WS, KALRA S, RESCH L, JOHNSON ES (2010): Inclusion body myositis masquerading as amyotrophic lateral sclerosis. *Can J Neurol Sci* 37, 687-691
- SCHMID D, PYPAERT M, MÜNZ C (2007): Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* 26, 79-92
- SCHMIDT J, RAKOCEVIC G, RAJU R, DALAKAS MC (2004): Upregulated inducible co-stimulator (ICOS) and ICOS-ligand in inclusion body myositis muscle: significance for CD8+ T cell cytotoxicity. *Brain* 127, 1182-1190
- SCHMIDT J, BARTHEL K, WREDE A, SALAJEGHEH M, BAHR M, DALAKAS MC (2008): Interrelation of inflammation and APP in sIBM: IL-1 beta induces accumulation of beta-amyloid in skeletal muscle. *Brain* 131, 1228-1240
- SCHWEICHEL JU, MERKER HJ (1973): The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253-266
- SEGLIN PO, GORDON PB (1982): 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 1889-1892
- SELCEN D, OHNO K, ENGEL AG (2004): Myofibrillar myopathy: clinical, morphological and genetic studies in 63 patients. *Brain* 127, 439-451
- SELKOE DJ (2001): Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766
- SINGH SB, DAVIS AS, TAYLOR GA, DERETIC V (2006): Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 313, 1438-1441
- SIVAKUMAR K, SEMINO-MORA C, DALAKAS MC (1997): An inflammatory, familial, inclusion body myositis with autoimmune features and a phenotype identical to sporadic inclusion body myositis. Studies in three families. *Brain* 120 (Pt 4), 653-661

- STEIMLE V, SIEGRIST CA, MOTTET A, LISOWSKA-GROSPIERRE B, MACH B (1994): Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265, 106-109
- SUGARMAN MC, KITAZAWA M, BAKER M, CAIOZZO VJ, QUERFURTH HW, LAFERLA FM (2006): Pathogenic accumulation of APP in fast twitch muscle of IBM patients and a transgenic model. *Neurobiol Aging* 27, 423-432
- SUZUKI K, OHSUMI Y (2007): Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 581, 2156-2161
- TAKESHIGE K, BABA M, TSUBOI S, NODA T, OHSUMI Y (1992): Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 119, 301-311
- TALLOCY Z, JIANG W, VIRGIN HWT, LEIB DA, SCHEUNER D, KAUFMAN RJ, ESKELINEN EL, LEVINE B (2002): Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 190-195
- TANIDA I, MINEMATSU-IKEGUCHI N, UENO T, KOMINAMI E (2005): Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 1, 84-91
- TAWIL R, GRIGGS R, THORNTON C, KISSEL J, MENDELL J, GENGE A, KARPATI G, JACKSON C, ROSE M, AMATO A (2004): Randomized pilot trial of high-dose beta INF-1a in patients with inclusion body myositis. *Neurology* 63, 718-720
- TAYLOR GA, FENG CG, SHER A (2004): p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* 4, 100-109
- TOOZE SA, YOSHIMORI T (2010): The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* 12, 831-835
- UCHIYAMA Y, SHIBATA M, KOIKE M, YOSHIMURA K, SASAKI M (2008): Autophagy-physiology and pathophysiology. *Histochem Cell Biol* 129, 407-420
- VAN DER PAS J, HENGSTMAN GJ, TER LAAK HJ, BORM GF, VAN ENGELEN BG (2004): Diagnostic value of MHC class I staining in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 136-139
- VARADHACHARY AS, WEIHL CC, PESTRONK A (2010): Mitochondrial pathology in immune and inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 22, 651-657
- VASSAR R, CITRON M (2000): Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. *Neuron* 27, 419-422
- VASSAR R (2004): BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 23, 105-114
- VATTEMI G, ENGEL WK, MCFERRIN J, BUXBAUM JD, PASTORINO L, ASKANAS V (2001): Presence of BACE1 and BACE2 in muscle fibres of patients with sporadic inclusion-body myositis. *Lancet* 358, 1962-1964
- VATTEMI G, ENGEL WK, MCFERRIN J, PASTORINO L, BUXBAUM JD, ASKANAS V (2003a): BACE1 and BACE2 in pathologic and normal human muscle. *Exp Neurol* 179, 150-158
- VATTEMI G, ENGEL WK, MCFERRIN J, ASKANAS V (2003b): Cystatin C colocalizes with amyloid-beta and coimmunoprecipitates with amyloid-beta precursor protein in sporadic inclusion-body myositis muscles. *J Neurochem* 85, 1539-1546
- VATTEMI G, ENGEL WK, MCFERRIN J, ASKANAS V (2004): Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in inclusion body myositis muscle. *Am J Pathol* 164, 1-7
- VENTRUTI A, CUERVO AM (2007): Autophagy and neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7, 443-451
- WALSH DM, KLYUBIN I, FADEEVA JV, ROWAN MJ, SELKOE DJ (2002): Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem Soc Trans* 30, 552-557
- WANG Y, SINGH R, MASSEY AC, KANE SS, KAUSHIK S, GRANT T, XIANG Y, CUERVO AM, CZAJA MJ (2008): Loss of macroautophagy promotes or prevents fibroblast apoptosis depending on the death stimulus. *J Biol Chem* 283, 4766-4777
- WATTS GD, WYMER J, KOVACH MJ, MEHTA SG, MUMM S, DARVISH D, PESTRONK A, WHYTE MP, KIMONIS VE (2004): Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet* 36, 377-381

- WIENDL H, HOHLFELD R, KIESEIER BC (2005): Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. *Trends Immunol* 26, 373-380
- WINSLOW AR, CHEN CW, CORROCHANO S, ACEVEDO-AROZENA A, GORDON DE, PEDEN AA, LICHTENBERG M, MENZIES FM, RAVIKUMAR B, IMARISIO S (2010): alpha-Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol* 190, 1023-1037
- WOLFE MS, XIA W, OSTASZEWSKI BL, DIEHL TS, KIMBERLY WT, SELKOE DJ (1999): Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513-517
- YAMAMOTO M, KIYOTA T, HORIBA M, BUESCHER JL, WALSH SM, GENDELMAN HE, IKEZU T (2007): Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am J Pathol* 170, 680-692
- YANG SN, HSIEH WY, LIU DD, TSAI LM, TUNG CS, WU JN (1998): The involvement of nitric oxide in synergistic neuronal damage induced by beta-amyloid peptide and glutamate in primary rat cortical neurons. *Chin J Physiol* 41, 175-179
- YORIMITSU T, KLIONSKY DJ (2005): Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1542-1552
- YU L, STRANDBERG L, LENARDO MJ (2008): The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival. *Autophagy* 4, 567-573
- YU WH, KUMAR A, PETERHOFF C, SHAPIRO KULNANE L, UCHIYAMA Y, LAMB BT, CUERVO AM, NIXON RA (2004): Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2531-2540
- YU WH, CUERVO AM, KUMAR A, PETERHOFF CM, SCHMIDT SD, LEE JH, MOHAN PS, MERCKEN M, FARMERY MR, TJERNBERG LO (2005): Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171, 87-98
- YUNIS EJ, SAMAHA FJ (1971): Inclusion body myositis. *Lab Invest* 25, 240-248

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Mathias Bähr möchte ich für die Möglichkeit danken, in seiner Abteilung promovieren zu können.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. Jens Schmidt für die Vergabe dieser interessanten Fragestellung, die unendliche Geduld, welche er über den Zeitraum der Erstellung dieser Arbeit immer wieder aufbrachte, das Vertrauen, das er von Anfang an in mich setzte sowie die immerwährende Unterstützung, die ich über die Jahre durch ihn erfahren habe.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Jan Lünemann bedanken, der mich während meines Forschungsaufenthaltes an der Rockefeller Universität in New York betreute, mich methodisch hervorragend und geduldig anleitete und mir in der Bearbeitung des Themas aber auch darüber hinaus immer zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christian Münz möchte ich für die überaus freundliche Aufnahme meiner Person in seinen Arbeitskreis bedanken, für die Nutzung seiner Laborräume und Materialien sowie die ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung, welche ich durch ihn erfahren habe.

Aufgrund der Tatsache, dass die in dieser Arbeit dargestellten Experimente in zwei verschiedenen Laboren durchgeführt wurden, bin ich zahlreichen Mitarbeitern zu großem Dank verpflichtet, ohne deren Hilfe diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre:

Dr. rer. nat. Konstanze Barthel, Dr. rer. nat. Seray Cetin sowie Dipl.-Biol. Claudia Fokken danke ich für ihre fachliche Unterstützung und die zahlreichen Hilfestellungen im Laboralltag. Ferner bin ich Dr. med. Anna Lünemann, Dr. med. Monique Ghannage sowie Dr. med. Monica Lee für ihre stets freundliche und unermüdliche Unterstützung im Labor dankbar.

Für ihre zuverlässige technische Unterstützung danke ich Fatima Betül Agdas, Nicole Tasch, Frida Takubetang Arrey sowie Susanne M. Roberts.

Can G. Pham, Dr. rer. nat. Matthias Schmitz sowie Stuart G Turville sei für ihren fachlichen Rat und ihre Mithilfe gedankt.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Muskelimmunbiologie“ möchte ich für die außerordentlich gute Arbeitsatmosphäre und freundliche Unterstützung danken. Der hervorragende Zusammenhalt und kollegiale Umgang innerhalb der Gruppe machten die zahlreichen im Labor verbrachten Stunden zu einem großen Vergnügen.

Ich danke Julia Stächele für ihre schnelle und zuverlässige Hilfe bei der Korrektur der vorliegenden Arbeit sowie ihre unermüdlichen Motivationshilfen.

Danksagung

Martin Aselmeyer, Dr. med. Eike Carstens, Johannes Dreyer, Karl Frontzek, Sascha Höfer und Fabian Tormin danke ich für ihre fachlichen und privaten Ratschläge, ihr Verständnis und dafür, sie zu meinen Freunden zählen zu dürfen.

Meinen Eltern, Veronika und Wolfgang Keller sowie meinen beiden Brüdern Patrick und Daniel möchte ich für ihre außerordentliche und bedingungslose Unterstützung danken, welche sie mir über Jahre entgegengebracht haben und ohne deren Hilfe ich diese Arbeit nicht hätte bewältigen können.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Heather Midgorden, der es immer gelang mich auch an zahlreichen Tiefpunkten wieder zu reaktivieren.

Curriculum vitae

Mein Name ist Christian Wolfgang Keller. Geboren wurde ich am 14. Juli 1980 in Lahr als zweites Kind von Wolfgang Keller und seiner Ehefrau Veronika Keller, geborene Schmäzle.

Von 1991 bis 2001 besuchte ich das Hans-Furler-Gymnasium in Oberkirch, an dem ich die Allgemeine Hochschulreife erlangte. Von 1998 bis 1999 besuchte ich im Rahmen eines Auslandsjahres die River Ridge Highschool in Lacey, USA. Nach dem Abitur leistete ich von September 2001 bis Juni 2002 meinen Zivildienst in der Tagesförderstätte *Sternstraße* der Protestantischen Stiftung Alsterdorf in Hamburg ab. Im Anschluss an den Zivildienst arbeitete ich von Juli 2002 bis März 2003 in einem Anstellungsverhältnis auf Abruf in der Wohngruppe *Lattenkamp* der Protestantischen Stiftung Alsterdorf in Hamburg. Während eines Auslandsaufenthaltes an der *Ecole France Langue Paris* in Frankreich von Juli bis August 2003 erweiterte ich meine Französischkenntnisse unter Erwerb des *Certificat D'Assiduité d'Ecole France Langue Paris*. Ab dem Wintersemester 2003/2004 studierte ich Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen und beendete den vorklinischen Abschnitt des Studienganges zum Ende des Wintersemesters 2006 mit dem Physikum. In der Zeit von März 2008 bis August 2009 arbeitete ich als studentische Aushilfskraft in der Abteilung für Allgemeinpsychiatrie des Asklepios Fachklinikums Göttingen. Im Rahmen meines Praktischen Jahres arbeitete ich von August 2009 bis November 2009 in der allgemein- und unfallchirurgischen Abteilung der Black Lion Universitätsklinik in Addis Abeba, Äthiopien. Diesem folgte ein viermonatiger Aufenthalt am *National Hospital for Neurology and Neurosurgery/Institute of Neurology* in London, Großbritannien in der Abteilung für Neurologie von Dezember 2009 bis März 2010. Mein drittes Tertial des Praktischen Jahres absolvierte ich in der Abteilung für Innere Medizin der Helios Albert-Schweitzer-Klinik in Northeim. Im November 2010 schloss ich den Studiengang Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen mit dem Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Am 3. Januar 2011 erhielt ich die Approbation als Arzt durch den Niedersächsischen Zweckverband zur Approbationserteilung. Seit April 2011 arbeite ich als Assistenzarzt in der Abteilung Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen.

Seit Oktober 2006 bin ich Mitglied der Arbeitsgruppe Muskelimmunbiologie von PD Dr. Jens Schmidt in der Abteilung Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen. Mein wesentliches Interesse gilt hierbei der Pathogenese der sporadischen Einschlusskörpermyositis. Das Thema meiner grundlagenwissenschaftlich- und pathogeneseorientierten Dissertation lautet „*Pathomechanismen der sporadischen Einschlusskörpermyositis: molekulare Interaktionen zwischen Autophagie, Zellstress und Akkumulation von β -Amyloid im Skelettmuskel*“. Von März bis August 2007 führte ich Teile meiner experimentellen Dissertation im Rahmen eines Forschungsaufenthalts im Labor für

virale Immunbiologie der Rockefeller Universität in New York City, USA durch. Dieser Forschungsaufenthalt wurde mir sowohl durch eine „*Travel allowance*“ der Boehringer Ingelheim Fonds als auch durch ein Stipendium der Universität Göttingen ermöglicht. Teile meiner Dissertation durfte ich bereits auf Kongressen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) in Hamburg im September 2008 sowie der *International Society of Neuroimmunology* (ISNI) in Fort Worth, USA im Oktober 2008 vorstellen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation entstanden folgende Veröffentlichungen:

Keller CW, Fokken C, Turville SG, Lünemann A, Schmidt J, Münz C, Lünemann JD (2011): TNF- α induces Macroautophagy and regulates MHC Class II expression in human skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 186, 3970-80

Keller CW, Lee M, Turville SG, Lünemann A, Schmidt J, Münz C, Lünemann JD (2008): TNF- α induces Macroautophagy and regulates MHC Class II expression in human skeletal myocytes. *J. Neuroimmunol* 203, 153
(Abstract).

Keller CW, Lee M, Turville SG, Bähr M, Münz C, Lünemann JD, Schmidt J (2008): Akkumulation von beta-Amyloid im Skelettmuskel: Zytokin-induzierte Modulation von Makroautophagie. *Akt Neurologie* 35(S01), 63
(Abstract).