

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

**B-Zell-Pathomechanismen der akuten und
chronischen Myositis: Ex-Vivo- und In-Vitro-
Untersuchungen**

Inaugural-Dissertation

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

**vorgelegt von
Luisa Margarita Hoffmann
aus Eutin
Göttingen 2014**

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter/in: PD Dr. J. Schmidt (Betreuer)

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Martin Weber (Korreferent)

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Martin Oppermann (Promotor)

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2014

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Sporadische Einschlusskörpermyositis (<i>sporadic Inclusion Body Myositis</i> , sIBM).....	1
1.1.1	Epidemiologie, Symptomatik und Verlauf.....	1
1.1.2	Pathomechanismen und Histopathologie.....	2
1.1.3	Diagnostik und Therapie.....	5
1.2	B-Zell-Funktionen im Rahmen von immunologischen Prozessen.....	6
1.3	Marker für B-Zell-assoziierte Mechanismen in der sIBM.....	7
1.3.1	Einführung.....	7
1.3.2	BAFF (<i>B-cell-activating factor</i>).....	7
1.3.3	APRIL (<i>a proliferation-including ligand</i>).....	8
1.3.4	Die Chemokine CXCL-12 und CXCL-13 (CXC-ligand).....	9
1.4	Myopathien.....	10
1.4.1	Einführung.....	10
1.4.2	Polymyositis (PM).....	11
1.4.3	Muskeldystrophien.....	13
2	Ziele der Arbeit.....	15
3	Material und Methoden.....	17
3.1	Zellbiologische Methoden und Materialien.....	17
3.1.1	Einführung.....	17
3.1.2	Zytokin-Exposition von Zellkulturen auf 8-Kammer-Objektträgern.....	17
3.1.3	Fixierung von 8-Kammer-Objektträgern.....	18
3.2	Immunbiologische Methoden und Materialien.....	18
3.2.1	Patienten und Kontrollen – Muskelbiopsate.....	18
3.2.2	Hämalaun- und Eosin-Färbung von Kryoschnitten.....	20
3.2.3	Immunzytochemische/immunhistochemische Färbungen.....	21
3.2.4	Fluoreszenzmikroskopische Analyse.....	22
3.3	Molekularbiologische Methoden und Materialien.....	23
3.3.1	RNA-Extraktion aus Gewebe/Zellkultur (24-Kammer-Platte).....	23
3.3.2	cDNA-Synthese.....	24
3.3.3	<i>Real-time</i> -Polymerase-Kettenreaktion.....	25

3.4	Statistische Methoden	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Einleitung.....	27
4.2	mRNA-Expression von BAFF, CXCL-12, APRIL und CXCL-13 in Muskelbiopsien von Patienten mit sIBM, PM und Dystrophien.....	27
4.3	Korrelation der mRNA-Expression der B-Zell-relevanten Marker BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 bei sIBM und PM	29
4.4	Quantifizierung histochemischer und immunhistochemischer Färbungen.....	32
4.5	mRNA-Expression von BAFF, CXCL-12, APRIL und CXCL-13 in gesunden Muskelzellen nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen.....	36
4.6	Proteinexpression von BAFF und CXCL-12 in Myoblasten und humanen Myotuben nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen.....	39
5	Diskussion	44
6	Zusammenfassung.....	51
7	Literaturverzeichnis	53

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
APRIL	<i>a proliferation-including ligand</i>
BAFF	<i>b-cell-activating factor</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CXCL	<i>CXC-ligand</i>
DAPI	4'6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle medium</i>
DMD	Duchenne'sche Muskeldystrophie
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H&E	Hämalaun- und Eosin
hIBM	hereditäre IBM
IBM	<i>inclusion body myositis</i>
ICOS	<i>inducible co-stimulator</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IVIG	intravenöse Immunglobuline
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>

MW	Mittelwert
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase-chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PM	Polymyositis
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROX	Carboxy-X-Rhodamin
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real-time-PCR</i>
SD	Standardabweichung
sIBM	sporadische IBM
TNF	Tumor-Nekrose Faktor

1 Einleitung

1.1 Sporadische Einschlusskörpermyositis (*sporadic Inclusion Body Myositis, sIBM*)

Die sporadische Einschlusskörpermyositis (*sporadic Inclusion Body Myositis, sIBM*) wird den entzündlichen Skelettmuskelerkrankungen zugeordnet. Sie ist die häufigste erworbene Myopathie bei Patienten jenseits des 50. Lebensjahres und betrifft im Verhältnis von etwa 3:1 vorwiegend das männliche Geschlecht. 1967 wurden erstmals IBM-ähnliche Veränderungen im Muskelgewebe beschrieben [Chou 1967]. 1971 fassten Yunis und Samaha eigene und aus der Literatur bekannte Beobachtungen zusammen und führten den Begriff „*Inclusion Body Myositis*“ ein [Yunis und Samaha 1971]. Neben der inflammatorischen Form (sIBM) existieren auch seltene vererbare Varianten (hereditäre IBM, hIBM), bei denen es sich um nicht-entzündliche Muskelerkrankungen handelt [Mitrani-Rosenbaum et al. 1996]. Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist die sporadische Einschlusskörpermyositis.

1.1.1 Epidemiologie, Symptomatik und Verlauf

Die sIBM tritt mit einer Prävalenz von 2,2 - 4,9 pro Million auf, mit dem Alter von über 50 Jahren steigt die Häufigkeit der Erkrankung auf Werte von bis zu 50 pro Million an. Die relative Prävalenz der Erkrankung unter den inflammatorischen Myopathien liegt bei 16 - 28% [Griggs et al. 1995]. Die sIBM ist eine chronisch progressive, entzündliche Skelettmuskelerkrankung, die einen variablen Krankheitsverlauf zeigt. Durchschnittlich erkranken die Patienten um das 55. Lebensjahr. Langsam fortschreitend kommt es zu Muskelschwäche und Atrophie distaler und proximaler Muskeln. Die Sensibilität bleibt dabei intakt. Entsprechend dem Befallsmuster der Erkrankung entwickeln die Patienten unterschiedliche Symptome. Die Muskelschwäche kann sich an den Extensoren des Fußes und Flexoren des Halses zeigen, häufiger sind aber vor allem die tiefen Fingerbeuger und die Oberschenkelstrecker betroffen [Amato et al. 1996], dies zeigt auch die Abbildung 1.1.



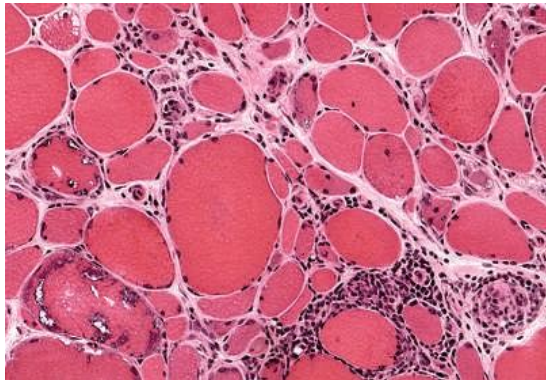
Abbildung 1.1: Patient mit sIBM. Auffallend sind die deutliche Atrophie der Oberschenkelmuskulatur und der tiefen Finger-Flexoren. Abb. aus *Engel und Askanas, Neurology 2006, S.21*.

Innerhalb einiger Jahre entwickeln die Patienten eine feinmotorische Schwäche, sodass ihnen beispielsweise das Umdrehen eines Schlüssels im Schlüsselloch oder das Aufheben von Gegenständen nicht mehr möglich ist. Im weiteren Verlauf prägen Gehschwierigkeiten das klinische Bild. Die Patienten stürzen häufig und haben Probleme, Treppen zu steigen. Auch das Aufstehen von Stühlen bereitet im Verlauf meist große Schwierigkeiten. Mit fortschreitender Krankheit sind die Patienten innerhalb von 5 - 20 Jahren meist auf Gehhilfen bis hin zum Rollstuhl angewiesen. In mindestens der Hälfte der Fälle ist zudem die Schluckmuskulatur mit betroffen, sodass die Patienten dysphagische Beschwerden entwickeln [Peng et al. 2000].

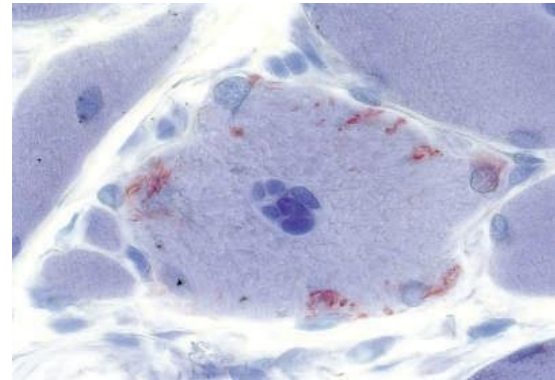
1.1.2 Pathomechanismen und Histopathologie

In Muskelbiopsien von sIBM-Patienten lassen sich histopathologisch typische myopathische sowie entzündliche Veränderungen nachweisen. Zu den myopathischen Pathologien zählen Faserkalibervariationen, atrophe Fasern, zentrale Kerne und bindegewebiger Umbau. Zudem lassen sich Ablagerungen von Proteinen zum Teil in Form von typischen filamentösen Einschlusskörperchen, die der Erkrankung ihren Namen geben, finden. Ein weiteres Charakteristikum sind Vakuolen, so genannte „red-rimmed vacuoles“ in Muskelfasern, die nicht von Lymphozyten umstellt sind. Ein

weiteres Merkmal ist das Nebeneinander von nekrotischen und regenerierenden Fasern. In den nicht-nekrotischen Muskelfasern liegen gehäuft entzündliche Infiltrate vor [Carpenter et al. 1978; Lotz et al. 1989]. Bei diesen infiltrierenden Zellen handelt es sich hauptsächlich um zytotoxische CD8+ T-Zellen. Daneben lassen sich auch B-Zellen nachweisen, hierbei handelt es sich hauptsächlich um differenzierte CD138+ Plasmazellen [Arahata und Engel 1986].



A



B

Abbildung 1.2: Muskelbiopsie von einem Patienten mit sporadischer Einschlusskörpermyostis, die einen charakteristischen histopathologischen Befund zeigt. **(A)** Entzündung und Vakuolen. Lymphozyten umstellen nicht-nekrotische, gesund aussehende Muskelfasern; in zwei Muskelfasern sind „red-rimmed vacuoles“ zu erkennen, diese Fasern werden nicht von Entzündungszellen infiltriert. Deutlich wird auch die Faserkalibervariation. **(B)** Intrazelluläre Ablagerungen von Amyloid. Abb. aus Dalakas, *Neurology* 2006, S.439.

Die Pathogenese der sIBM ist sehr komplex und bisher noch nicht vollständig verstanden. Im Muskel von Patienten mit sIBM scheinen degenerative und autoimmun-entzündliche Prozesse parallel abzulaufen [De Bleecker et al. 2002]. Zum einen kommt es degenerativ zur Akkumulation aberranter Proteine wie Tau, β -Amyloid und α -Synuklein, die auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer eine Rolle spielen [Askanas und Engel 2007]. Zum anderen liegt bei der sIBM eine Entzündung vor, die der Polymyositis (PM) ähnlich ist. Neben der Invasion von zytotoxischen T-Zellen in den Muskel ist eine gesteigerte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen nachweisbar [Raju et al. 2003]. Entzündliche Mediatoren spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der sIBM, durch sie werden verschiedene zelluläre und humorale Autoimmunprozesse initiiert und

aufrechterhalten. Die Muskelfasern selbst exprimieren vermehrt einige Zytokine wie Interleukin (IL) -1β , Interferon (IFN) $-\gamma$ oder Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) $-\alpha$ [Tews und Goebel 1996] und Chemokine wie CXCL-9 und CXCL-10 [De Paepe et al. 2009] und erhalten somit ein lokal entzündliches Milieu aufrecht, das die Infiltration von Muskelfasern durch Immunzellen begünstigen kann. Zusätzlich haben einige dieser Zytokine wie IL- 1β und TNF- α einen direkt destruirenden Effekt auf die Muskelfasern und führen so bereits zu einem massiven Muskelschaden [Broussard et al. 2004; Li et al. 2005]. Des Weiteren konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass es unter diesen entzündlichen Konditionen zu einer Hochregulation von *Major Histocompatibility Complex I* (MHC-I) auf der Oberfläche von Muskelfasern kommt [Emslie-Smith et al. 1989]. Dieser Proteinkomplex ist physiologischerweise auf nahezu allen kernhaltigen Zellen nachzuweisen und dient der Antigenpräsentation. Auf gesunden Muskelfasern ist er normalerweise nicht exprimiert. Die Überexpression von MHC-I ist ubiquitär im Muskel von Patienten mit sIBM nachzuweisen, auch in Arealen ohne Zellinfiltration und deutet auf Antigen-vermittelte Zytotoxizität und entzündliche Prozesse in der Pathogenese der sIBM hin [Dalakas 1992; van der Pas 2004]. Diese Überexpression von MHC-I ist typisch für die sIBM und auch für die Polymyositis. In anderen chronischen Myopathien oder Dystrophien fehlt MHC-I oder ist nur auf degenerativen Muskelfasern nachzuweisen. Einige Hinweise lassen vermuten, dass bei der sIBM eine spezifische T-Zell-vermittelte Immunabwehr gegen das Muskelgewebe abläuft. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine klonale Expansion von T-Zellen im Muskel vorliegt, die über mehrere Jahre persistiert [Amemiya 2000; Bender et al. 1998; Müntzing et al. 2003; Dalakas 2006a]. Zudem finden sich auf den Muskelfasern ko-stimulatorische Moleküle wie ICOS-L, deren Rezeptoren sich auf CD8⁺ T-Zellen befinden [Schmidt et al. 2004]. Sowohl die Expression von MHC-I und MHC-II, als auch die Expression von ko-stimulatorischen Molekülen werden durch pro-inflammatorische Zytokine in Muskelzellen hochreguliert [Schmidt et al. 2004]. Dies verdeutlicht einmal mehr, dass entzündliche Mechanismen von grundlegender Bedeutung in der Pathogenese der sIBM sind. Im Jahr 2008 konnte erstmals gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Entzündung und Degeneration besteht. Es gelang der Nachweis einer Ko-Lokalisation von β -Amyloid mit IL- 1β im Muskelgewebe von sIBM-Patienten. Zudem konnte demonstriert werden, dass IL- 1β die β -Amyloid-Akkumulation fördern kann [Schmidt et al. 2008]. Inwieweit entzündliche und degenerative Mechanismen in der Patho-

genese der sIBM genau zusammenhängen und sich gegenseitig bedingen, bleibt jedoch bisher unklar. Ein mögliches Zusammenspiel wäre, dass degenerative Prozesse entzündliche Zellstressreaktionen auslösen können. Umgekehrt könnte der entzündliche Zellstress die Fehlfaltung von Proteinen beeinflussen. So würde ein sich selbst aufrechterhaltender Kreislauf entstehen, der das Zugrundegehen von Muskelfasern bedingt.

1.1.3 Diagnostik und Therapie

Die Diagnostik der sIBM ist umfangreich und sehr komplex. Häufig wird die Einschlusskörpermyositis als Polymyositis fehldiagnostiziert. Die Diagnose einer sIBM wird dann oft erst im Verlauf gestellt, wenn die Patienten nicht auf ihre Therapie ansprechen [Dalakas 1992]. Die Diagnose einer sIBM sollte daher immer erwogen werden, wenn der Patient das typische Alter aufweist und es sich um einen langsam voranschreitenden Krankheitsverlauf handelt, der sich auf distale und proximale Muskelgruppen bezieht. Allgemein werden zur Diagnosesicherung einer sIBM verschiedene Kriterien herangezogen, die klinische, laborchemische und elektrophysiologische Befunde einschließen. Von grundlegender Bedeutung in der Diagnostik ist die Muskelbiopsie mit histopathologischem Befund. Auch die Familienanamnese kann zur Sicherung der Diagnose herangezogen werden [Griggs et al. 1995]. Zu den klinischen Kriterien gehört das Bestehen der Symptomatik seit mindestens sechs Monaten, ein Lebensalter von über 30 Jahren bei Erstmanifestation der Erkrankung und die Muskelschwäche distaler und proximaler Muskelgruppen an Armen und Beinen [Sayers et al. 1992]. Initial kann die Kreatinkinase im Serum um das 10-fache erhöht sein, im Verlauf finden sich laborchemisch jedoch nur leicht erhöhte Muskelenzyme [Lotz et al. 1989]. In der Elektromyographie lassen sich pathologische Auffälligkeiten nachweisen, die dem Muster entzündlicher Myopathien ähneln [Julien et al. 1982]. Histopathologisch stehen unter anderem der Nachweis multifokaler lymphozytärer Infiltrationen nicht-nekrotischer Muskelfasern, für die Erkrankung typische „red-rimmed vacuoles“ und Kongo-Rot-positive Amyloid-Ablagerungen im Vordergrund [Griggs et al. 1995].

Bis heute ist es noch nicht gelungen, eine effektive Behandlung für die sIBM zu entwickeln, die den Krankheitsverlauf aufhalten oder die Erkrankung sogar heilen

kann. Verschiedene Therapiestudien mit immunsuppressiven Substanzen wie Glukokortikoide, Azathioprin oder Methotrexat führten zu keiner signifikanten Verbesserung des Krankheitsverlaufes [Griggs et al. 2006]. Auch die Therapie mit Interferon- β brachte keinen Behandlungserfolg [Muscle Study Group 2001; Muscle Study Group 2004]. Bei etwa 25% der Patienten aus zwei kontrollierten Studien führte die Therapie mit intravenösen Immunglobulinen (IVIg) zu einer kurzfristigen Besserung der Schluckfunktion und der Muskelkraft in den Beinen, das Gesamtergebnis der Studie zeigte jedoch keinen signifikanten Erfolg [Dalakas et al. 1997; Walter et al. 2000]. Das Nichtansprechen der verschiedenen Therapien könnte viele Gründe haben. Zum einen ist bei der Behandlung der Einschlusskörpermyositis der frühe Therapiezeitpunkt entscheidend. Viele Patienten mit sIBM werden aufgrund des langsamen Krankheitsverlaufes und der dadurch herausgezögerten Diagnosestellung erst spät therapiert. Zu diesem Zeitpunkt spielen degenerative Mechanismen bereits eine Rolle [Layzer et al. 2009]. Des Weiteren sind die Muskelfasern selbst an der Produktion und Sekretion von Zytokinen beteiligt. Mit Standardimmunsuppressiva ist es wahrscheinlich nicht möglich, diesen durch unbekannte Faktoren getriggerten Kreislauf zu durchbrechen. In einer Studie von 2009 konnte gezeigt werden, dass eine T-Zell-Depletion mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Alemtuzumab (CAMPATH 1-H) bei einigen Patienten eine Verlangsamung der Erkrankungsprogression brachte [Dalakas et al. 2009].

Aufgrund der wenig effektiven Behandlungsmöglichkeiten der sIBM zum heutigen Zeitpunkt sind die Bemühungen groß, Angriffspunkte für mögliche neue Therapien zu finden und weitere Kenntnisse über Zusammenhänge in der Pathogenese der sIBM zu erlangen. Dies ist der zentrale Hintergrund der vorliegenden Arbeit.

1.2 B-Zell-Funktionen im Rahmen von immunologischen Prozessen

B-Zellen sind über verschiedene Funktionen an der Pathogenese immunbedingter neurologischer Erkrankungen beteiligt. B-Zellen können Antikörper produzieren, die Gewebe entweder durch Antikörper-gesteuerte Zytotoxizität mittels Komplementaktivierung oder nachfolgender Makrophagenaktivität schädigen. Des Weiteren agieren B-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen und können somit die Produktion von verschiedenen Zytokinen durch aktivierte T-Zellen bewirken und nachfolgend

eine klonale Expansion von zytotoxischen T-Zellen induzieren. Eine weitere Funktion der B-Zellen ist die Produktion von Zytokinen selbst. Über IL-10, IL-6 und TNF- α können wiederum T-Zellen, aber auch Makrophagen aktiviert werden, die Gewebeschaden verursachen können. Bei den meisten neurologischen Erkrankungen, die autoimmun bedingt sind, sind die Autoantikörper gegen Antigene aus dem Zytosol gerichtet und können das Gewebe nicht direkt schädigen. In diesen Fällen sind B-Zellen meist noch über Antikörper-unabhängige Mechanismen wie Antigen-Präsentation, Co-Stimulation, Produktion von Zytokinen und Koordination von T-Zell-Funktionen an immunologischen Pathomechanismen beteiligt [Browning 2006; Martin und Chan 2006]. Die Tatsache, dass B-Zellen neben der Antikörperproduktion auf so vielfältige Art und Weise an komplexen Autoimmunprozessen beteiligt sein können, macht sie zu einem attraktiven Ziel bei der Entwicklung neuer Therapien.

1.3 Marker für B-Zell-assoziierte Mechanismen in der sIBM

1.3.1 Einführung

In der vorliegenden Dissertation wurden Muskelbiopsie-Proben von Patienten mit sIBM, Polymyositis (PM) und Dystrophien im Vergleich zu nicht-myopathisch veränderten Kontrollmuskeln bezüglich der Expression verschiedener entzündlicher Marker untersucht. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt.

1.3.2 BAFF (*B-cell-activating factor*)

BAFF ist ein Zytokin, das zu der TNF (*tumor necrosis factor*)-Familie gehört und auch als BLyS (*B-lymphocyte Stimulator*), TALL-1, zTNF4, THANK oder TNFSF-13B bekannt ist [Moore 1999]. Das für BAFF codierende Gen liegt auf dem Chromosom 13. Die Expression und Sekretion von BAFF erfolgt durch Immunzellen wie Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen, aber auch durch nicht-lymphoide Zellen wie Epithelzellen, Astrozyten oder Fibroblasten [Mackay et al. 2002]. Als wichtiger Regulator von B-Zellen spielt BAFF eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, die charakterisiert sind durch die

Produktion von Autoantikörpern gegen körpereigene Antigene bei Verlust der B-Zell-Toleranz. Eine erhöhte Expression von BAFF findet sich beispielsweise bei Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes, dem Sjögrensyndrom, der rheumatoiden Arthritis oder der Myasthenia gravis [Stohl et al. 2003; Jonsson et al. 2005; Ragheb et al. 2008]. BAFF ist ebenso im Rahmen von Infektionen, allergischen und malignen Erkrankungen erhöht exprimiert. Die Hochregulation von BAFF kann durch IFN- γ , IL-10 und durch den CD40-Liganden auf B-Zellen beeinflusst werden [Morimoto et al. 2007]. BAFF bindet an drei spezifische Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität. Mit hoher Affinität bindet BAFF an den BAFF-R (Rezeptor), auch als BR3 bekannt, und an TACI (*transmembrane activator-calcium modulator und cyclophilin ligand interactor*), mit einer geringeren an BCMA (*B-cell maturation antigen*) [Mackay et al. 2003; Sutherland et al. 2005]. Die Bindung an diese Rezeptoren führt zu unterschiedlichen Funktionen im Immunsystem. BAFF-R befindet sich auf Oberflächen von B- und Effektor-T-Zellen [Novak 2004]. Über diesen Rezeptor werden das B-Zell-Überleben und die B-Zell-Reifung gesteuert, zudem wird die Produktion von IgE-Antikörpern beeinflusst. Auch die Co-Stimulation von T-Zellen läuft über BAFF-R ab. TACI befindet sich nur auf der Oberfläche von B-Zellen. Über diesen Rezeptor wird der Klassenwechsel von Antikörpern in B-Zellen gesteuert. Zusätzlich ist TACI an der Produktion von Antikörpern, besonders der Klasse IgA, beteiligt [Moisini und Davidson 2009; Morimoto et al. 2007; Mackay und Leung 2006]. BCMA befindet sich auf Plasmazellen und den Vorläufer-Blasten, über diese wird das Plasmazellüberleben reguliert. Zusammengefasst beeinflusst BAFF das periphere B-Zell-Überleben, die B-Zell-Reifung, die Produktion und den Klassenwechsel von Antikörpern und ist zudem an der Co-Stimulation von T-Zellen beteiligt [Mackay und Mackay 2002]. BAFF ist somit als ein wichtiger Immunmodulator von besonderer Bedeutung und ist an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und an klonaler B-Zell-Expansion wesentlich beteiligt.

1.3.3 APRIL (*a proliferation-including ligand*)

Das Zytokin APRIL ist in seiner molekularen Struktur nah verwandt mit BAFF und gehört ebenso zur TNF-Familie [Hahne et al. 1998]. Es wird von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen produziert und sezerniert. Wie auch BAFF

wird APRIL zunächst als Transmembranprotein synthetisiert und dann durch Abspaltung in die lösliche Form überführt [Bodmer et al. 2002]. APRIL teilt sich mit BAFF die zwei Rezeptoren BCMA und TACI [Salzer et al. 2007] und bindet im Vergleich zu BAFF mit einer 10-fach höheren Affinität an den BCMA - Rezeptor auf Plasmazellen und Vorläufer-Blasten [Madry 1998]. Diese unterschiedliche Affinität und die Tatsache, dass BCMA nur auf Oberflächen von Plasmazellen exprimiert wird, lassen vermuten, dass APRIL besonders für die Aufrechterhaltung des Plasma-Zell-Pools im Knochenmark verantwortlich ist. Die Funktion von APRIL ist im Gegensatz zu BAFF noch nicht vollständig geklärt. APRIL scheint Co-Stimulator von B- und T-Zellen zu sein [Hahne et al. 1998] und reguliert wie BAFF die B-Zell-Entwicklung, fördert das Überleben *in situ* und die klonale Expansion von B-Zellen [Dillon et al. 2006]. Es konnte gezeigt werden, dass APRIL an der Plasmazell-Differenzierung und dem Plasmazell-Überleben beteiligt ist [Belnoue et al. 2008; Bossen et al. 2007] und zudem den Klassenwechsel von Antikörpern beeinflusst [Litinsky et al. 2002]. Auch an der Induktion von Tumor-Zellwachstum kann APRIL beteiligt sein [Hahne et al. 1998]. Eine Studie zeigte, dass APRIL auch als ein pro-apoptotischer Faktor bei Apoptose-Prozessen involviert sein kann [Kelly et al. 2000]. Verschiedene Maus-Modelle stützen die These, dass APRIL wie auch BAFF eine essentielle Rolle übernimmt im Rahmen von B-Zell-Überleben, T-Zell-Co-Stimulation, Autoimmunerkrankungen und Krebserkrankungen [Mackay et al. 2003; Dillon et al. 2006; Schneider 2005].

1.3.4 Die Chemokine CXCL-12 und CXCL-13 (CXC-ligand)

Chemokine sind eine Gruppe kleiner (~8-14 kDa), strukturell verwandter Signalproteine, die an der zellulären Kommunikation beteiligt sind. Sie lassen sich in zwei Gruppen einteilen, nämlich in homöostatische und inflammatorische Chemokine. Chemokine sind von grundlegender Bedeutung in der Rekrutierung von Immunzellen und steuern über Chemotaxis die Einwanderung von Leukozyten aus dem Blut in das Gewebe an den Entzündungsort [Luster 1998]. Über 40 verschiedene humane Chemokine sind bisher identifiziert, sie werden von unterschiedlichen Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten und Lymphozyten produziert und sezerniert [Zlotnik und Yoshie 2000]. Hauptsächlich wirken Chemokine auf Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten und spielen eine entscheidende Rolle bei

Abwehrmechanismen. Chemokine binden an 7-Transmembran-Rezeptoren, die sich an Oberflächen von Immunzellen befinden. CXCL-12, auch bekannt als SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*), und CXCL-13 sind neben CXCL-10 bedeutende Chemokine für die B-Zell-Homöostase. CXCL-12 bindet an den Rezeptor CXCR-4 [Ma et al. 1998; Tachibana et al. 1998; Zou et al. 1998] und CXCL-13 an CXCR-5 [Gunn et al. 1998; Legler et al. 1998]. In den vergangenen Jahren wurde anhand mehrerer Studien deutlich, dass Chemokine nicht nur wichtige Moleküle im Rahmen inflammatorischer Prozesse sind, sondern auch als wichtige Immunmodulatoren wirken und die Lymphopoese beeinflussen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bei Mäusen, die einen Mangel an CXCL-12 aufweisen, die B-Zell-Lymphopoese gestört ist [Nagasawa et al. 1996]. CXCL-13 ist ein wichtiger Ligand für die B-Zell-Migration. In einer Studie von 2008 konnte demonstriert werden, dass BAFF die CXCL-13-abhängige Chemotaxis von Gedächtnis-B-Zellen steigern kann [Badr et al. 2008]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Chemokine eine bedeutende Rolle im Rahmen von immunologischen Prozessen spielen. In der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen begünstigen Chemokine die Infiltration des Gewebes durch Entzündungszellen.

1.4 Myopathien

1.4.1 Einführung

Myopathien lassen sich einteilen in Dystrophien, Myositiden, Myotonien, Myotone Dystrophie und metabolisch, endokrin, mitochondrial oder toxisch bedingte Muskelerkrankungen. In der vorliegenden Arbeit werden vier Patientengruppen miteinander verglichen. Neben Biopsien von sIBM-Patienten werden auch Muskelbiopsien von Patienten mit Polymyositis und Muskeldystrophien untersucht und nicht-myopathisch veränderten Kontrollen gegenübergestellt. Die folgenden Abschnitte sollen einen kurzen Überblick über Polymyositis und Muskeldystrophien, hierbei aufgrund der Vielzahl der Dystrophien im Speziellen über die Muskeldystrophie Typ Duchenne, geben.

1.4.2 Polymyositis (PM)

Die Polymyositis ist eine subakute, primär entzündliche Muskelerkrankung, die innerhalb von Wochen bis Monaten zu einer Muskelschwäche hauptsächlich proximaler Muskeln führt [Griggs et al. 1995] und gehört neben der sIBM und der Dermatomyositis (DM) zu der Gruppe der idiopathisch inflammatorischen Myopathien [Dalakas 1991 und Griggs et al. 1995]. Insgesamt liegt die Prävalenz der idiopathisch inflammatorischen Myopathien bei 0,5 - 9,3 pro Million [Cronin und Plotz 1990]. Unter ihnen ist die Polymyositis die am seltensten vorkommende Form. Die Erkrankung betrifft häufiger Frauen als Männer und tritt typischerweise nach dem 18. Lebensjahr auf. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr, Kinder sind äußerst selten betroffen [Ramanan und Feldman 2002]. Auffallend ist, dass die Polymyositis nur selten isoliert vorliegt. Häufig ist sie assoziiert mit anderen Erkrankungen und tritt im Rahmen von Autoimmunprozessen, Immunschwäche, Kollagenosen oder viralen Infektionen auf [van der Meulen et al. 2003]. Histopathologisch ähneln die Entzündungsprozesse der Polymyositis denen der sIBM. Im Vordergrund steht ein klar T-Zell-vermittelter Autoimmunprozess, der sich gegen Muskelfasern richtet [Arahata und Engel 1986]. Es kommt perivaskulär, perimysial und endomysial zur Invasion von T-Zellen, Makrophagen und wenigen B-Zellen. Vorwiegend handelt es sich, wie bei der sIBM, um CD8+ T-Zellen, die nicht-nekrotische, MHC-I exprimierende Muskelfasern umstellen und Phagozytose und Muskelfasernekrose bedingen [Dalakas 1995]. Auch die klonale Expansion von T-Zellen konnte in Muskelbiopsien von Polymyositis-Patienten nachgewiesen werden [Benveniste et al. 2004]. Im Unterschied zur sIBM gibt es in der Pathogenese der Polymyositis neben der entzündlichen Komponente keine Hinweise auf degenerative Mechanismen, Vakuolen sowie Amyloid-Ablagerungen sind nicht typisch. Das klinische Bild der Polymyositis ist gekennzeichnet durch Muskelschwäche der proximalen Muskeln, daneben können aber auch distale Muskelgruppen betroffen sein. Die Gesichtsmuskulatur ist zuerst nicht involviert. Im Vordergrund stehen symmetrische, proximale Paresen von Armen und Beinen, die sich innerhalb von Wochen bis Monaten ausbilden. Die Feinmotorik bleibt bei der Polymyositis im Gegensatz zur sIBM lange erhalten [Dalakas 1991]. Neben Muskelschwäche beklagen die Polymyositis-Patienten auch Muskelschmerzen in Ruhe und bei Belastung, verminderte Ausdauer und Muskelkrämpfe. Im Vordergrund der Diagnostik stehen

die Bestimmung von Muskelenzymen im Serum, die Elektromyographie und insbesondere die Muskelbiopsie. Die Kreatinkinase im Serum kann bis um das 50-fache erhöht sein und korreliert mit der Krankheitsaktivität. Mittels Elektromyographie lassen sich Myopathie-typische Auffälligkeiten nachweisen. Besonderen Stellenwert in der Diagnosefindung hat die Muskelbiopsie, sie ist aber auch bei falscher Interpretation häufig der Grund für eine Fehldiagnose [Dalakas 2011]. Zur histopathologischen Diagnostik einer Polymyositis gehört der Nachweis von multifokalen Infiltrationen durch zytotoxische T-Zellen, die nicht-nekrotische Muskelfasern umstellen [Dalakas und Hohlfeld 2003], zudem der Nachweis von MHC-I-Expression auf den Muskelfasern. So können oft toxische oder dystrophische Myopathien ausgeschlossen werden [Dalakas 2002]. Die Abgrenzung der Polymyositis von der sIBM gelingt häufig durch den klinischen Phänotyp und den Nachweis von den bei der sIBM vorhandenen Vakuolen bzw. Proteinaggregationen. Im Zweifel muss die Biopsie wiederholt werden. Im Gegensatz zur sIBM spricht mit etwa 80% der größte Teil der Patienten mit Polymyositis auf eine Therapie mit Kortikosteroiden an. Eine Verbesserung des klinischen Bildes ist typischerweise etwa 3-6 Monate nach Beginn der Steroid-Therapie zu erkennen. Bei 10-33% dieser Patienten ist die Symptomatik sogar komplett rückläufig [Joffe et al. 1993]. Um Steroide zu „sparen“, werden auch Standardimmunsuppressiva wie Azathioprin, Methotrexat, Cyclosporin A und Cyclophosphamid in der Behandlung der Polymyositis eingesetzt. Diesen Substanzen kommt ebenso bei unzureichendem Therapieerfolg allein mit Glukokortikoiden große Bedeutung zu. Auch intravenöse Immunglobuline werden in einigen Fällen angewendet. Unter der medikamentösen Therapie kommt es zu einem Absinken der Kreatinkinase im Serum und zur Verbesserung der Muskelkraft. Obwohl die entzündlichen Mechanismen in der Pathogenese der sIBM und der Polymyositis sehr ähnlich ablaufen, ist bis heute unklar, warum sIBM-Patienten nicht auf Steroide ansprechen. Andere Pathomechanismen scheinen eine entscheidende Rolle zu spielen. Es ist daher von Bedeutung, die beiden Krankheitsbilder immer auch vergleichend zu sehen, um das Verständnis der Pathogenese der sIBM zu fördern.

1.4.3 Muskeldystrophien

Der Terminus Muskeldystrophie umfasst eine heterogene Gruppe von 40 bis 50 unterschiedlichen dystrophen Muskelerkrankungen [Ozawa 2010]. Allgemein handelt es sich um genetisch bedingte degenerative Muskelerkrankungen, die primär, aber nicht ausschließlich die Skelettmuskulatur betreffen. Sie führen chronisch fortschreitend zu Muskelschwäche und Muskelschwund. Klinisch zeigt sich Atrophie und Kräfteverlust der betroffenen Muskulatur. Unter den Muskeldystrophien tritt die Muskeldystrophie Typ Duchenne (auch Duchenne'sche Muskeldystrophie, DMD) weltweit mit der höchsten Prävalenz auf und ist nicht nur die häufigste, sondern auch die schwerwiegendste neuromuskuläre Erkrankung im Kindesalter [Ozawa 2010]. Es handelt sich um eine X-chromosomal rezessive Vererbung [Gowers 1879], die etwa eines von 3500 männlichen Neugeborenen betrifft [Deconinck und Dan 2007]. Ursächlich für die Duchenne'sche Muskeldystrophie sind Mutationen in einem Gen, das in der Region Xp21 liegt und das für das Protein Dystrophin codiert [Hoffman et al. 1992]. Zu etwa 98% der Fälle handelt es sich um *frameshift*-Mutationen, bei denen das Leseraster komplett verschoben wird. Diese Mutationen führen praktisch zu einem vollständigen Verlust des Proteins. Dystrophin ist essentieller Bestandteil der funktionstüchtigen Muskelfaser und verknüpft als ein Teil des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes das Aktin-Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix [Ervasti und Campbell 1993]. Auf diese Weise wird das Sarkolemm stabilisiert und vor dem Auseinanderreißen während der Muskelkontraktion geschützt [Zubrzycka-Gaarn et al. 1988]. Bei Dystrophinmangel sind die Muskelfaserbestandteile nur unzureichend verankert und durch mechanische Beanspruchung entstehen Nekrosen und Hypertrophie einzelner Muskelfasern. Progressive Degeneration von Skelett- und Herzmuskulatur mit lokaler lymphozytärer Infiltration und fibrotischem Umbau ist die Folge [Deconinck und Dan 2007]. Die genaue Pathogenese des Umbaus ist noch nicht vollständig geklärt. Betroffene Jungen fallen im Alter von 3-5 Jahren mit zunehmender proximal beinbetonter Muskelschwäche auf, die beispielsweise das Treppensteigen und Gehen weiterer Strecken zunehmend erschwert und zu einem pendelnden Gangbild führt. Schwäche der Hüft- und Kniestrecker bedingen das charakteristische Gowers-Zeichen. Um sich aufzurichten, „klettern“ die betroffenen Kinder an sich empor. Der Krankheitsverlauf ist gekennzeichnet durch zunehmende Muskelschwäche und -lähmung mit Rollstuhlpflichtigkeit meist um das zehnte

Lebensjahr [Emery 1998]. Neben der motorischen Schwäche besteht häufig auch eine mentale Entwicklungsstörung. Die mentale Symptomatik ist aber im Gegensatz zur motorischen nicht progredient. Im zweiten Lebensjahrzehnt treten bei den Patienten typischerweise lebensverkürzende Lungenfunktionsstörungen und Kardiomyopathien auf, die häufig um das 20. Lebensjahr zum Tode führen [Bushby et al. 2010]. In der Diagnostik der Duchenne'schen Muskeldystrophie spielt die genetische Analyse eine bedeutende Rolle. Der Nachweis einer Mutation im Dystrophingen sichert die Diagnose einer Dystrophinopathie und macht in der Regel eine Muskelbiopsie zur Diagnosefindung überflüssig. Laborchemisch ist eine stark erhöhte Kreatinkinase im Serum auffällig. Die Duchenne'sche Muskeldystrophie ist derzeit nicht heilbar. Um Lebensqualität und Lebenserwartung zu verbessern, werden die Patienten symptomatisch therapiert. Hauptelemente der multidisziplinären Behandlung sind neben Physiotherapie und orthopädisch-chirurgischen Maßnahmen bei Kontrakturen und Skoliose die Dauertherapie mit Steroiden, die nicht-invasive Heimbeatmung bei respiratorischer Insuffizienz und die frühzeitige medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz. Die Lebenserwartung kann je nach Krankheitsverlauf bis zu 40 Jahre betragen, häufig liegt sie jedoch deutlich darunter.

2 Ziele der Arbeit

In der Pathogenese der sIBM spielen sowohl degenerative als auch entzündliche Prozesse eine Rolle. Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass entzündliche Mechanismen von grundlegender Bedeutung bei der sIBM sind. Bisher konnte gezeigt werden, dass es vorwiegend zur Invasion von CD8+ T-Zellen im Muskel kommt [Dalakas 2006]. Einige Daten sprechen auch dafür, dass B-Zell-Mechanismen bei der Erkrankung eine Rolle spielen könnten [Bradshaw et al. 2007].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, B-Zell-Mechanismen in der Pathogenese der sIBM im Vergleich zu anderen Myopathien zu untersuchen, um daraus möglicherweise neue Strategien für die Behandlung der sIBM ableiten zu können und das Verständnis des Pathomechanismus der sporadischen Einschlusskörpermyositis zu fördern. Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden.

- 1) *Welche Rolle spielt die Expression der Marker BAFF und APRIL, die an Aktivierung und Rekrutierung von B-Zellen beteiligt sind, und der Chemokine CXCL-12 und CXCL-13, die Einfluss auf die B-Zell-Regulation haben, für die entzündlichen Mechanismen in der Pathogenese der sIBM auf mRNA-Ebene?*

Mittels quantitativer PCR sollte die Expression der Marker BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 in Muskelbiopsien von sIBM-Patienten gemessen und mit der Expression in Biopsien von Patienten mit Polymyositis, Dystrophien und nicht-myopathisch veränderten Kontrollen verglichen werden.

- 2) *Welche Rolle spielt die Expression von BAFF und CXCL-12 für die B-Zell-Mechanismen in der Pathogenese der sIBM auf Proteinebene?*

Über serielle immunhistochemische, fluoreszente Doppelfärbungen und quantitative Analyse sollte die Expression und Ko-Lokalisation der Marker BAFF und CXCL-12 in Biopsien von Patienten mit sIBM bestimmt und der Polymyositis, den Dystrophien und den nicht-myopathisch veränderten Kontrollen gegenübergestellt werden. Zur Zelltypisierung sollten zudem die Expression der Marker CD20 und CD3 mittels

Immunhistochemie bestimmt werden. Pro Patient sollten drei Doppelfärbungen angefertigt werden, jeweils in folgender Kombination: BAFF und CD20, CXCL-12 und CD3, MHC-I und MHC-II. Der vierte Serienschnitt sollte nach H&E gefärbt werden, um histochemisch-morphologische Auffälligkeiten darzustellen.

- 3) *Gibt es funktionelle Zusammenhänge der Überexpression von BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 im Rahmen der Pathogenese der sIBM und lässt sich die Expression durch andere Mediatoren, die bei Entzündungsprozessen in der sporadischen Einschlusskörpermyositis eine Rolle spielen, beeinflussen?*

Es sollten In-Vitro-Experimente an humanen Muskelzellen durchgeführt werden. Nach der Stimulation mit verschiedenen Zytokinen, einzeln und in Kombination, über Zeiträume von 12, 24 und 48 Stunden sollte im Vergleich zu Kontrollen quantitativ die Expression von BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 auf mRNA-Ebene bestimmt werden. Über immunzytochemische Färbungen nach Stimulation mit Zytokinen und quantitative Analyse sollte die Expression von BAFF und CXCL-12 auf Proteinebene bestimmt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden und Materialien

3.1.1 Einführung

Versuche mit Zellkulturen und Zellkultivierung erfolgten unter einer Sterilbank der Sicherheitsklasse II (HERAEUS, Hanau, Deutschland). Medien und andere flüssige Materialien wurden vor ihrer Verwendung autoklaviert oder hitzesterilisiert und vor Gebrauch in einem Wasserbad (LAUDA, Lauda-Königshofen, Deutschland) auf 37°C erwärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank (HERAEUS, Hanau, Deutschland) bei 37°C in einem CO₂-Gehalt von 5% in feuchter Atmosphäre. Für Versuche mit Zellkulturen wurden zum einen humane, adhärent wachsende Myoblasten der Rhabdomyosarkoma-Zelllinie CCL136 verwendet. Zum anderen wurden für Zellkulturexperimente ausgereifte Myotuben von gesunden Kontrollen verwendet. Für die Zellkultivierung von CCL136 wurden 75 cm² Gewebeskulturflaschen (IN VITRO SYSTEMS & SERVICE, Göttingen, Deutschland) mit dem Nährmedium DMEM (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland, 4,5% Glukose) mit 10% FCS (PAA, Pasching, Österreich), 1% Penicillin/Streptomycin (BIOCHROM AG, Berlin, Deutschland) und 1% Glutamin verwendet. Unter dem Lichtmikroskop (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) wurde die Zell-Konfluenz beurteilt. Ab einer Konfluenz von etwa 80% wurden die Zellen geteilt. Nach einmaligem Waschen mit warmem PBS (INVITROGEN, Carlsbad, USA) und einer ein-minütigen Inkubation bei 37°C in warmem Trypsin (GIBCO, Karlsruhe, Deutschland, 0,05% Trypsin-EDTA) in frischem Medium wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst.

3.1.2 Zytokin-Exposition von Zellkulturen auf 8-Kammer-Objektträgern

Ab einer Konfluenz der Myoblasten von etwa 70% bzw. nach Erhalt einer ausdifferenzierten, mehrkernigen Myotubenkultur auf den 8-Kammer-Objektträgern (NUNC GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland) erfolgte ein Waschschriff mit 37°C warmem PBS. Anschließend wurde mit verschiedenen Zytokinen stimuliert.

Dazu wurden Variationen der pro-inflammatorischen rekombinanten, humanen Zytokine IFN- γ (300 U/ml), TNF- α (10 ng/ml), IL-1 β (20 ng/ml) (CHEMICON INTERNATIONAL, Inc., Temecula, USA) in X-Vivo (LONZA, Verviers, Belgien) verdünnt und auf die 8-Kammer-Objektträger gegeben. Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei 37°C über Zeiträume von 12, 24 und 36 Stunden. Für den Abbruch der Zytokin-Stimulation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit warmem PBS gewaschen, bevor die Plastikkammern vom Objektträger abgelöst wurden. Die Zellen wurden kurz an der Luft angetrocknet und fixiert.

3.1.3 Fixierung von 8-Kammer-Objektträgern

Die 8-Kammer-Objektträger wurden mit Aceton (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) und mit PFA-Methanol (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES, Hatfield, UK, 4% PFA) fixiert. Für die Aceton-Fixierung wurden die 8-Kammer-Objektträger 10 Min. in Aceton bei -20°C inkubiert. Für die Fixierung mittels PFA-Methanol wurden die Objektträger zunächst bei Raumtemperatur 10 Min. mit PFA fixiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation in Methanol bei -20°C. Abschließend wurden die 8-Kammer-Objektträger an der Luft getrocknet und dann bei -80°C aufbewahrt oder umgehend gefärbt.

3.2 Immunbiologische Methoden und Materialien

3.2.1 Patienten und Kontrollen – Muskelbiopsate

Es wurden je neun Muskelbiopsate von Patienten mit sIBM, PM und Dystrophie sowie neun nicht-myopathisch veränderte Kontrollen verwendet (siehe Tabellen 1 bis 4). Die Biopsien wurden von den neuropathologischen Abteilungen der Universitätsmedizin Göttingen, der Universität Hannover, Halle und München und der Kinderklinik Göttingen zur Verfügung gestellt. Die Biopsate wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und gemäß histologischen Kriterien untersucht. Die für die vorliegende Arbeit erhaltenen Proben umfassten pro Patient je 4 Objektträger mit Muskelbiopsieschnitten für immunhistochemische Serienfärbungen und Gewebe-

proben zur RNA-Extraktion. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben, um mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*Real-time Polymerase Chain-Reaction*, RT-PCR) die Expression verschiedener Marker zu untersuchen.

Tabelle 1: sIBM-Patienten

sIBM	Geschlecht	Alter
1	M	55 Jahre
2	F	76 Jahre
3	M	51 Jahre
4	M	62 Jahre
5	M	64 Jahre
6	M	71 Jahre
7	M	72 Jahre
8	M	72 Jahre
9	M	71 Jahre

Tabelle 2: Polymyositis (PM)-Patienten

PM	Geschlecht	Alter
1	F	61 Jahre
2	F	68 Jahre
3	F	76 Jahre
4	F	73 Jahre
5	F	68 Jahre
6	F	60 Jahre
7	F	66 Jahre
8	M	45 Jahre
9	F	66 Jahre

Tabelle 3: Dystrophie-Patienten

Dystrophie	Geschlecht	Alter	Diagnose
1	M	3 Jahre	DMD
2	M	13 Jahre	LGMD 2 I
3	M	4 Jahre	FSHD
4	F	47 Jahre	LGMD 2 I
5	F	47 Jahre	Dystrophie unklarer Ätiologie
6	M	47 Jahre	unkl. LGMD
7	M	42 Jahre	Dystrophie unklarer Ätiologie
8	M	22 Jahre	Dystrophie unklarer Ätiologie
9	F	30 Jahre	Dystrophie unklarer Ätiologie

Tabelle 4: Kontrollpatienten

Kontrolle	Geschlecht	Alter
1	F	73 Jahre
2	M	41 Jahre
3	F	52 Jahre
4	F	45 Jahre
5	F	49 Jahre
6	M	48 Jahre
7	F	23 Jahre
8	F	36 Jahre
9	F	55 Jahre

3.2.2 Hämalan- und Eosin-Färbung von Kryoschnitten

Von den Muskelbiopsieschnitten wurde je ein Objektträger pro Patient mit Hämalan- und Eosin (H&E) gefärbt. Für die Färbung wurden die Gefrierschnitte mit 4% PFA für 10 Min. bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit

PBS gewaschen und danach für 10 Min. in Hämalun (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) nach Mayer inkubiert. Darauf wurden sie für 10 Min. mit handwarmem H₂O gewässert und dann für 30 Sek. mit Eosin (MERCK, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger wiederum mit H₂O gespült. Abschließend erfolgte die Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 5 Min. zweimal in 70%-, 96%- sowie 99%-Ethanol und zweimal in Xylol (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) für je 10 Min. Zum Schluss wurden die Schnitte eingedeckelt und bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.3 Immunzytochemische/immunhistochemische Färbungen

Alle Antikörper-Inkubationen erfolgten in einer dunklen, feuchten Kammer. Für immunzyto-/immunhistochemische Färbungen wurden die restlichen 3 Gefrierschnitte mit Aceton und die 8-Kammer-Objektträger mit Aceton bzw. vergleichend auch mit PFA-Methanol fixiert. Nach Trocknung an der Luft wurden die einzelnen Kammern bzw. das Gewebe mit einem Pap-Pen (SCI SCIENCE SERVICES, München, Deutschland) umrandet. Anschließend erfolgte für 45 Min. die Blockierung mit einem 1:1-Gemisch aus 10% BSA und 100% Ziegenserum (beides JACKSON ImmunoResearch, West Grove, USA), um unspezifische Bindung zu verhindern. Es folgte die Inkubation mit dem in 1x BSA verdünnten jeweiligen Primärantikörper in entsprechender Konzentration (siehe Tabelle 5) über 1 Std. bei Raumtemperatur. Danach wurden die Objektträger dreimal in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (MOLECULARE PROBES, Leiden, Niederlande) in der Konzentration von 1:600 für 45 Min. Für die Doppelfärbungen erfolgte darauf eine weitere Primär- und Sekundärantikörper-Inkubation. Es wurden doppelt gefärbt: BAFF und CD20, CXCL-12 und CD3, MHC I und MHC II. Abschließend wurden alle Objektträger 45 Sek. mit DAPI 1:50.000 gefärbt, kurz an der Luft getrocknet und mit Fluoromount-G (SOUTHERN BIOTECH, Birmingham, USA) eingedeckelt. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 5: Primärantikörper

Liste der für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten primären Antikörper

Spezifität	Hersteller	Spezies	Inkubation und Konzentration
BAFF	ABCAM, Cambridge, USA	Ratte	1 Std. bei RT, 1:1000
CXCL-12	R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA	Maus	1 Std. bei RT, 1:1000
CD20	DAKO, Carpinteria, USA	Maus	1 Std. bei RT, 1:100
CD3	SEROTEC, Oxford, UK	Ratte	1 Std. bei RT, 1:50
MHC I	SEROTEC, Oxford, UK	Ratte	1 Std. bei RT, 1:200
MHC II	ANCELL, Bayport, USA	Maus	1 Std. bei RT, 1:100

Tabelle 6: Sekundärantikörper

Liste der für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten sekundären Antikörper

Spezifität	Hersteller	Spezies	Inkubation und Konzentration
Alexa 594	MOLECULAR PROBES, Leiden, NL	Ziege	45 Min. bei RT, 1:600
Alexa 488	MOLECULAR PROBES, Leiden, NL	Ziege	45 Min. bei RT, 1:600

3.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Die Untersuchung der fluoreszent markierten Zellen bzw. der Gewebsschnitte erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Typ Axiovert 200M (ZEISS, Oberkochen, Deutschland), es wurden die 20er und 40er Objektive verwendet. Die Filtereinstellungen wurden entsprechend der Emissionswellenlänge des jeweiligen Farbstoffes verwendet (rot für Alexa 594, grün für Alexa 488, blau für DAPI). Die Aufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera (Retiga 1.300, Qimaging, Burnaby,

Kanada) angefertigt und die Belichtungseinstellungen für alle Patienten konstant gehalten. Pro Biopsieschnitt wurden mehrere Aufnahmen angefertigt und anschließend die jeweiligen korrespondierenden Ausschnitte beurteilt. Für die Grauwertanalyse wurden die Aufnahmen mit IrfanView (IRFAN SKILJAN, Wien, Österreich) invertiert und die medianen Grauwerte anschließend mittels Scion Image (SCION CORPORATION, Maryland, USA) bestimmt.

3.3 Molekularbiologische Methoden und Materialien

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

Die RNA-Extraktion wurde auf Eis durchgeführt. Für die RNA-Extraktion aus der Zellkultur (24-Kammer-Platten, IN VITRO SYSTEMS & SERVICE, Göttingen, Deutschland) wurde das Qiagen-RNeasy Kit (QIAGEN INC., Valencia, USA) verwendet. Die RNA wurde in 33 µl RNase-freiem H₂O (GIBCO, Karlsruhe, Deutschland) eluiert. Gewebe der Muskelbiopsien wurde in 1,5 ml Küvetten (EPPENDORF, Hamburg, Deutschland) gegeben, 500 µl Trizol hinzugefügt und mit einem Zelmörser homogenisiert. Nach 5 Min. Inkubation bei RT wurden die Gefäße für 10 Min. bei 4°C mit 14.000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Küvetten überführt und mit 5 µg „linear Acrylamid“ (Ambion 9.520) 10 Sek. gemischt. Danach wurden 100 µl Chloroform dazugegeben, erneut für 30 Sek. gemischt und für 5 Min. bei 4°C mit 14.000 U/Min. zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde wiederum in neue Küvetten gefüllt und 240 µl Isopropanol dazugegeben. Die Gefäße wurden geschüttelt und gemischt. Anschließend erfolgte die Präzipitation für 30 Min. bei -80°C. Danach wurde erneut für 30 Min. bei 4°C mit 14.000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl RNase-freiem 70%-Ethanol gewaschen. Es folgte wiederum eine Zentrifugation für 10 Min. bei 4°C mit 14.000 U/Min. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Erneut wurden die Gefäße für 1 Min. zentrifugiert, um anschließend den restlichen Überstand zu entfernen. Das Pellet wurde für 1–2 Min. an der Luft getrocknet, und danach in 33 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit wurde das NanoDrop-Spektrophotometer (PEQLAB, Erlangen, Deutsch-

land) entsprechend der Herstellerangaben benutzt. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die RNA bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

3.3.2 cDNA-Synthese

Zur Synthese der zur *messengerRNA* (mRNA) komplementären cDNA (*complementary DNA*) wurde das SuperScript-Kit (INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde als Primer für die RNA-abhängige DNA-Polymerase ein Oligo-Desoxythymidin-Nukleotid, welches komplementär zur mRNA ist, eingesetzt. Durch einen Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix und die reverse Transkriptase (beides INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland) wurde der komplementäre cDNA-Strang gebildet. In der sich anschließenden Reaktion wurde die Ursprungs-RNA eliminiert und eine doppelsträngige cDNA gebildet. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.3 *Real-time*-Polymerase-Kettenreaktion

Für die RT-PCR wurde das TaqMan®-Sonden-System von Applied Biosystems (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA) verwendet. Die Durchführung erfolgte an einem 7500 Real-Time-PCR-System. Die verwendeten Primer (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA) sind in Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7: Primer / Proben der RT-PCR

Liste für bei RT-PCR verwendete Primer

Primer	Assay ID
Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	Hs99999905_m1
<i>B-Cell-Activating Factor</i> (BAFF)	Hs00198106_m1
<i>A Proliferation-Including Ligand</i> (APRIL)	Hs00182565_m1
CXCL-12	Hs00171022_m1
CXCL-13	Hs00757930_m1

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression der Marker BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 wurden pro 20 µl Ansatz 10 µl PCR 2xMix (INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland), 8,5 µl H₂O, 0,04 µl ROX (INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland), 0,5 µl cDNA und 1 µl Primer Probe verwendet. Der PCR 2xMix enthielt die Taq-DNA-Polymerase, Magnesiumchlorid, DNA-Glykosylasen, Desoxyribonukleosidtriphosphate und Stabilisierer. Der Farbstoff ROX (Carboxy-X-Rhodamin) wurde dazugegeben, um pipettierbedingte Volumenunterschiede der PCR-Proben auszugleichen. Die mRNA-Expression wurde jeweils in Triplikaten bestimmt. Die RT-PCR wurde jeweils mit gleicher Einstellung (Tabelle 8) durchgeführt.

Tabelle 8: Einstellung der RT-PCR

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

Bei der Auswertung wurde die relative mRNA-Expression der einzelnen Marker gegen die relative mRNA-Expression von GAPDH gemessen und verrechnet.

3.4 Statistische Methoden

Für alle statistischen Analysen wurde mit GraphPad Prism V4 (Graph Pad Software Inc, La Jolla, USA) gearbeitet. Unterschiede zwischen sIBM, PM, Muskeldystrophie und Kontrolle wurden anhand von T-Tests berechnet. Signifikanzen wurden wie folgt definiert: * = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$ und *** = $P \leq 0,001$. Statistische Ausreißer wurden mit Hilfe des Grubb's Test von Graph Pad ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Einleitung

Die Pathologie der sIBM ist sehr komplex. Sie beinhaltet entzündliche und degenerative Mechanismen. Im Jahr 2008 konnte erstmals gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen diesen Mechanismen besteht [Schmidt et al. 2008]. Inwieweit sich Entzündung und Degeneration jedoch gegenseitig beeinflussen, ist zum heutigen Zeitpunkt noch nicht geklärt. Es ist bekannt, dass entzündliche Mechanismen in der Pathogenese der sIBM eine bedeutende Rolle spielen. Bisher konnte gezeigt werden, dass zytotoxische T-Zellen das Muskelgewebe von sIBM-Patienten infiltrieren und es zu einer klonalen Expansion von T-Zellen im Muskel kommt [Amemiya 2000]. Auch B-Zellen scheinen in der Pathogenese der sIBM eine Rolle zu spielen [Bradshaw et al. 2007].

In dieser Studie sollen B-Zell-Mechanismen in der sIBM untersucht werden. Dazu wird die mRNA-Expression der relevanten Marker, die an Aktivierung und Rekrutierung von B-Zellen beteiligt sind, mittels quantitativer RT-PCR untersucht: BAFF, APRIL und die Chemokine CXCL-12 und CXCL-13. Es werden vier Patientengruppen von jeweils 9 Patienten miteinander verglichen. Die sIBM wird der Polymyositis (PM), den Muskeldystrophien und den nicht-myopathisch veränderten Kontrollen gegenübergestellt. Die Proteinexpression von BAFF und CXCL-12 wurde immun-histochemisch mittels fluoreszenter Doppelfärbung an Serienschnitten bezüglich Ko-Lokalisationen untersucht. In Muskelzellen wurden mittels PCR und Immun-zytochemie *in vitro* dieselben Marker nach Exposition zu TNF- α , IFN- γ , IL-1 β oder Kombinationen dieser Zytokine im Vergleich zur Kontrolle analysiert.

4.2 mRNA-Expression von BAFF, CXCL-12, APRIL und CXCL-13 in Muskelbiopsien von Patienten mit sIBM, PM und Dystrophien

Im Muskel von je 9 sIBM-, Polymyositis- und Muskeldystrophie-Patienten wurde mittels RT-PCR die mRNA-Expression von BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit 9 Kontrollen verglichen.

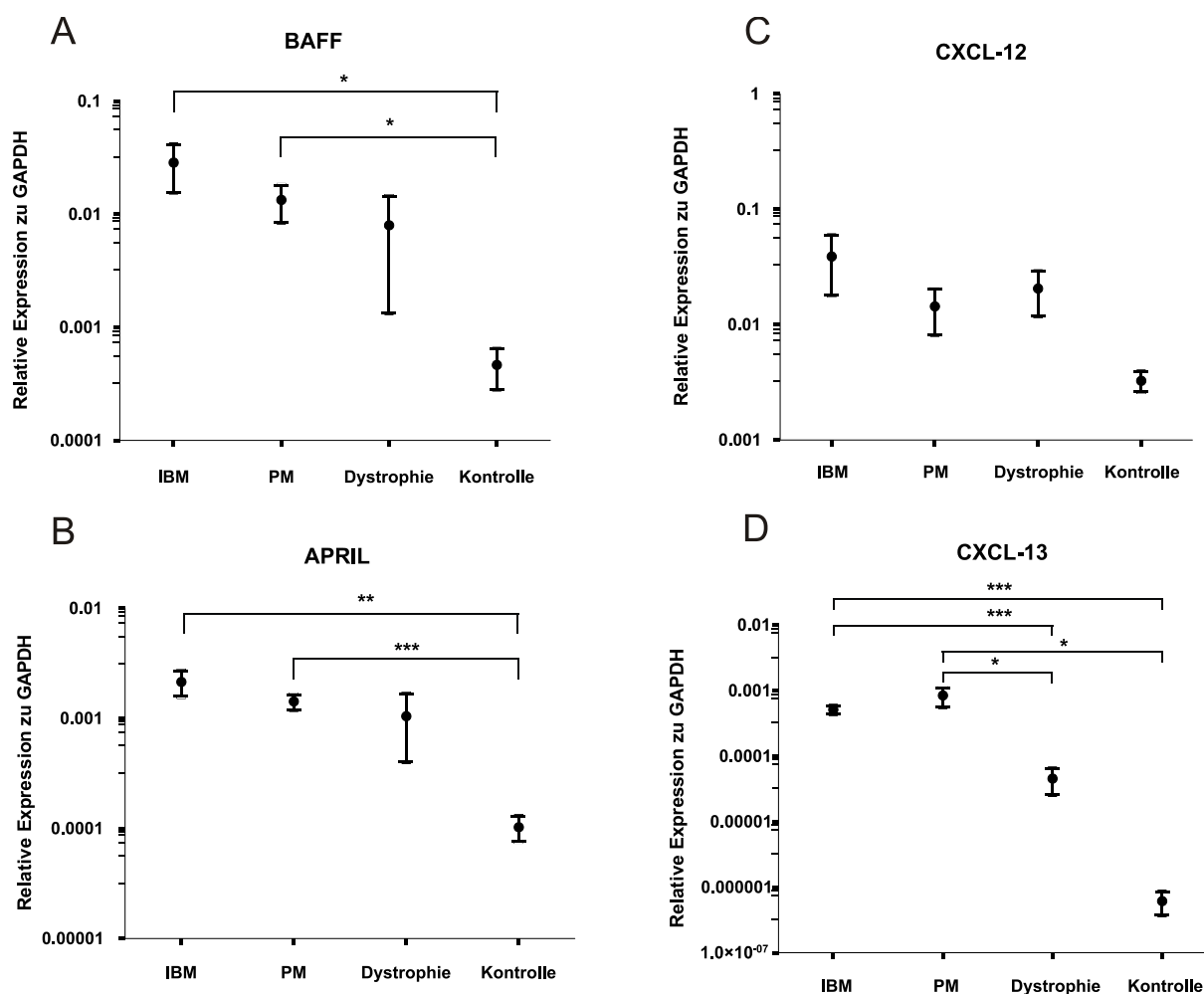


Abbildung 4.1: mRNA-Expression von BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 im Muskel von Patienten mit sIBM, Polymyositis und Muskeldystrophien im Vergleich zu nicht-myopathisch veränderten Kontrollen. (A/B) Signifikant erhöhte mRNA-Expression von BAFF und APRIL in sIBM und PM. **(C)** Erhöhte mRNA-Expression von CXCL-12 in sIBM und PM im Vergleich zur Kontrolle. **(D)** Signifikant erhöhte mRNA-Expression von CXCL-13 in sIBM und PM im Vergleich zur Dystrophie und zur Kontrolle. Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung; n=9.

Die mRNA-Expression wurde jeweils relativ zur Expression des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gemessen. Dieses Enzym kommt ubiquitär in allen Zellen des Körpers vor. Die mRNA-Expression aller untersuchten Marker relativ zur Expression von GAPDH wurde mit der mRNA-Expression von nicht-myopathischen Kontrollen ebenfalls relativ zur Expression von GAPDH verglichen. Zuvor wurde eine Berechnung statistischer Ausreißer mittels des Grubb's Tests durchgeführt. Insgesamt waren BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 in jeweils 9 Muskelbiopsien von sIBM- und Polymyositis-Patienten detektierbar. Die

mittlere mRNA-Expression von BAFF war bei der sIBM und der PM im Vergleich zu nicht-myopathischen Kontrollen signifikant ($P \leq 0,05$) erhöht, wohingegen bei Dystrophien die BAFF-Expression im Muskel ohne Signifikanz erhöht war (vgl. Abb. 4.1 A). Das mit BAFF verwandte Zytokin APRIL war bei Patienten mit sIBM und PM im Vergleich zu Kontrollen signifikant (sIBM: $P \leq 0,01$; PM: $P \leq 0,001$) hochreguliert und bei der Dystrophie im Vergleich zur Kontrolle erhöht, jedoch wiederum ohne Signifikanz (vgl. Abb. 4.1 B). Die mRNA-Expression des pro-inflammatorischen Markers CXCL-12 war bei allen Erkrankungsgruppen im Vergleich zur Kontrolle erhöht, jedoch wurde keine statistische Signifikanz erreicht (vgl. Abb. 4.1 C). Die Expression von CXCL-13 war bei Dystrophien im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant erhöht, die CXCL-13-Expression in der sIBM und PM dagegen war signifikant im Vergleich zu Dystrophie (sIBM: $P \leq 0,001$; PM: $P \leq 0,05$) und Kontrolle (sIBM: $P \leq 0,001$; PM: $P \leq 0,05$) erhöht (vgl. Abb. 4.1 D).

4.3 Korrelation der mRNA-Expression der B-Zell-relevanten Marker BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 bei sIBM und PM

Um Zusammenhänge der Marker BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 bei der sIBM, PM und im Muskel von Patienten mit Dystrophie im Vergleich zu Kontrollen zu untersuchen, wurden statistische Korrelationen der Marker berechnet. Hierbei zeigte sich eine signifikante ($P \leq 0,001$) Korrelation der mRNA-Expression des Faktors BAFF mit der des B-Zell-homöostatischen Chemokins CXCL-12 in Biopsien von sIBM-Patienten (vgl. Abb. 4.2). In Muskelbiopsien von Patienten mit PM oder Dystrophien ergaben sich für die mRNA-Expression der untersuchten Marker keine signifikanten Korrelationen (vgl. Abb. 4.3 und 4.4).

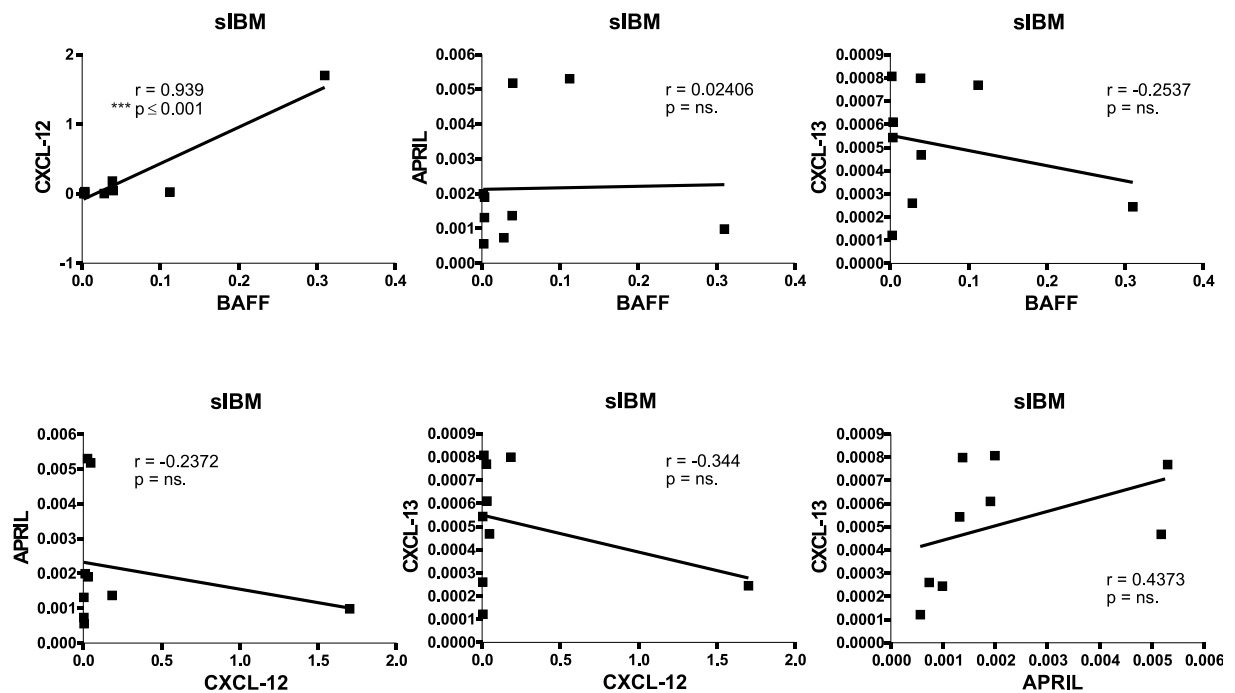


Abbildung 4.2: Korrelation der mRNA-Expression der Marker BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 im Muskel von Patienten mit sIBM. Die Expression von BAFF korreliert signifikant mit der von CXCL-12. Für weitere Marker ergeben sich keine signifikanten Korrelationen.

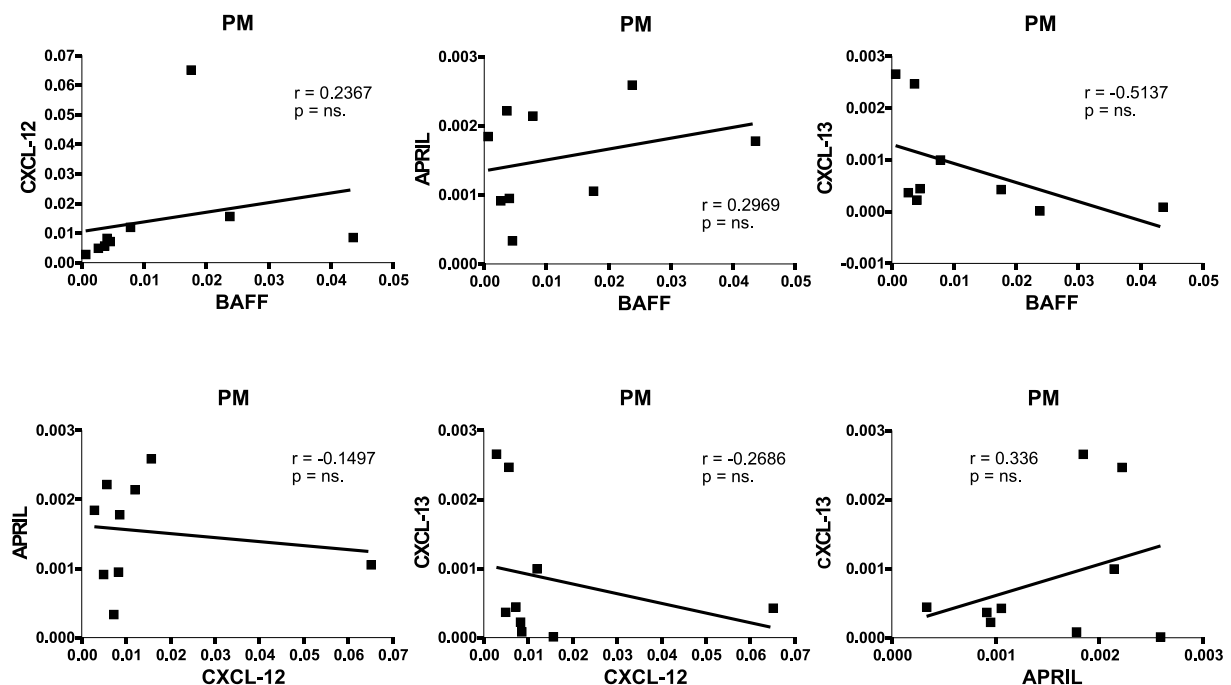


Abbildung 4.3: Korrelation der mRNA-Expression der Marker BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 im Muskel von Patienten mit PM. Es ergeben sich keine signifikanten Korrelationen.

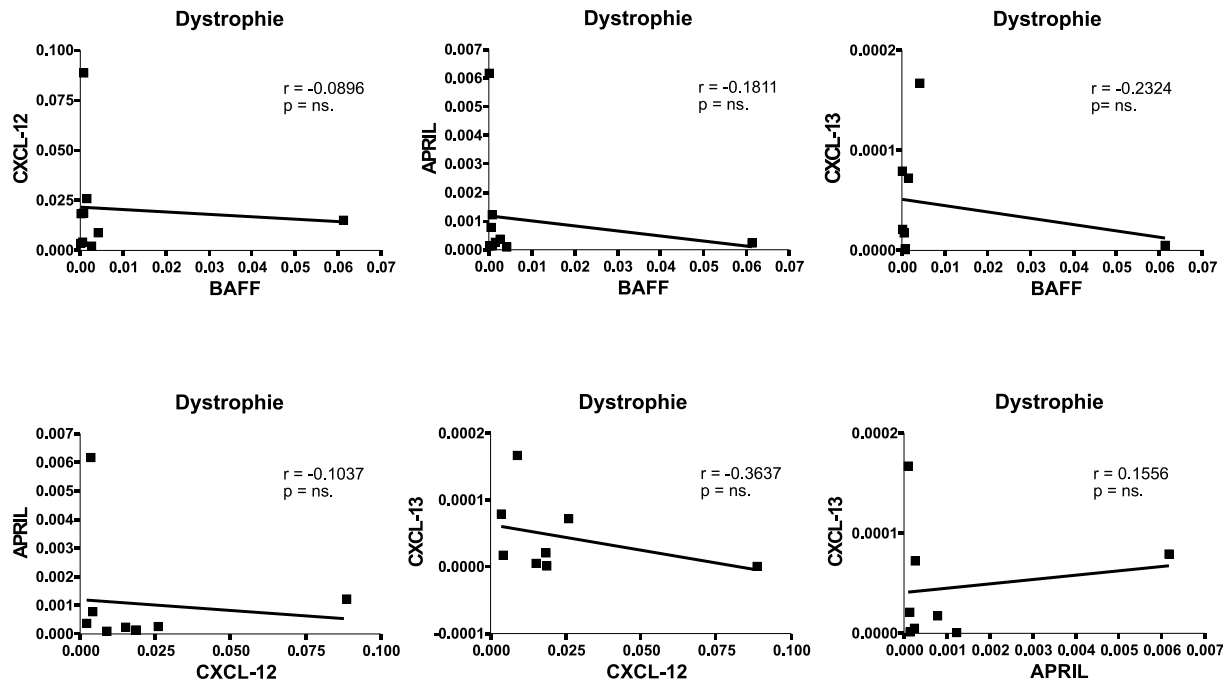


Abbildung 4.4: Korrelation der mRNA-Expression der Marker BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 in Biopsien von Patienten mit Muskeldystrophie. Es ergeben sich keine signifikanten Korrelationen.

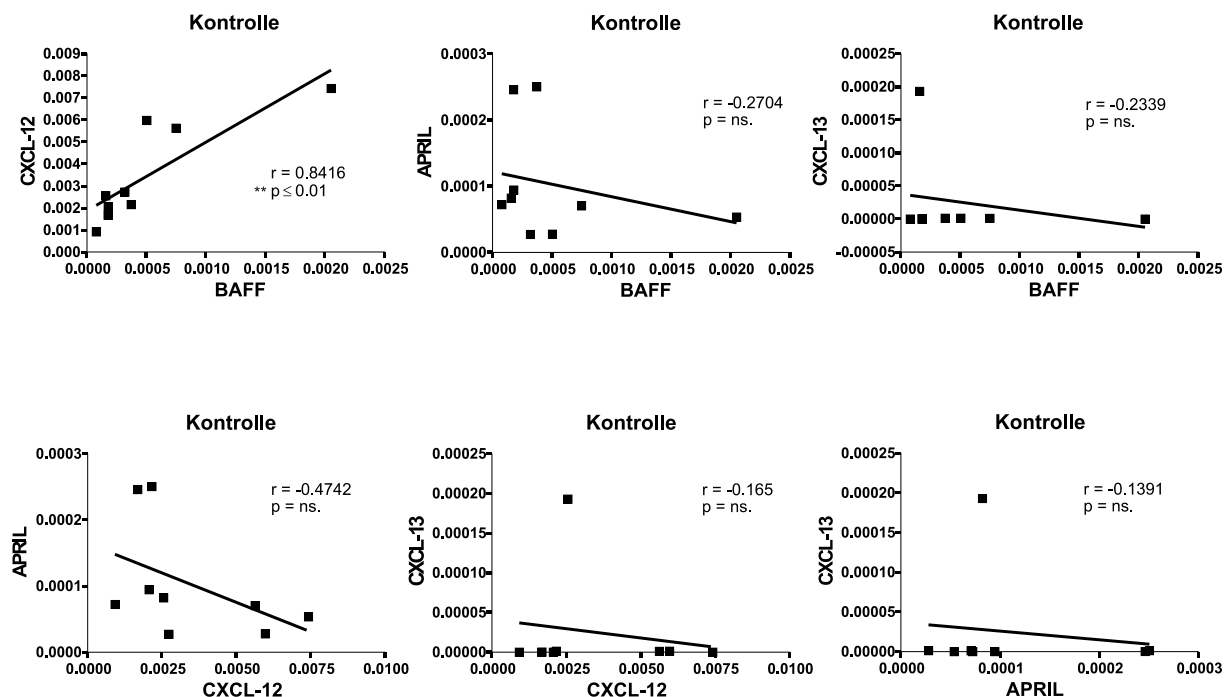


Abbildung 4.5: Korrelation der mRNA-Expression der Marker BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 in Kontrollmuskeln. Die Expression von BAFF korreliert signifikant mit der von CXCL-12. Für weitere Marker ergeben sich keine signifikanten Korrelationen.

4.4 Quantifizierung histochemischer und immunhistochemischer Färbungen

Gefrierschnitte von 5 Patienten mit sIBM wurden in Serie gefärbt und Schnitten von Patienten mit PM und Muskeldystrophie, sowie nicht-myopathisch veränderten Kontrollen gegenübergestellt. Morphologische Veränderungen wurden histochemisch anhand der H&E-Färbungen dargestellt. In den Muskelbiopsieschnitten von Patienten mit sIBM konnten morphologische Auffälligkeiten wie Atrophie - diese machten einen Großteil der Veränderungen aus - Faserkalibervariation, Nekrose, internalisierte Zellkerne, Einschlusskörperchen und Vakuolen nachgewiesen werden. Zudem waren Zellinfiltrate auffällig.

Immunhistochemisch jeweils in Doppelfärbungen wurden der inflammatorische B-Zell-Marker BAFF und der B-Zell-Oberflächen-Marker CD20, der Entzündungs-Marker CXCL-12 und der T-Zell-Oberflächen-Marker CD3, sowie zusätzlich nur an sIBM- und PM- Schnitten die Oberflächenmarker MHC-I und MHC-II fluoreszent angefärbt, um deren Expression und Ko-Lokalisationen zu untersuchen. Gefärbt wurde mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen oben genannte Strukturen. Die quantitative Auswertung der Muskelfasern erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Dabei wurden insgesamt 2231 Muskelfasern aus den jeweils korrespondierenden Arealen in Muskelbiopsieschnitten untersucht, pro Patient zwischen 78 und 233 Muskelfasern, und mittels einer CCD-Kamera mit einem 40er Objektiv fotografiert. Die angegebenen Prozentzahlen entsprechen dem Prozentwert der für die einzelnen Marker auswertbaren Fasern.

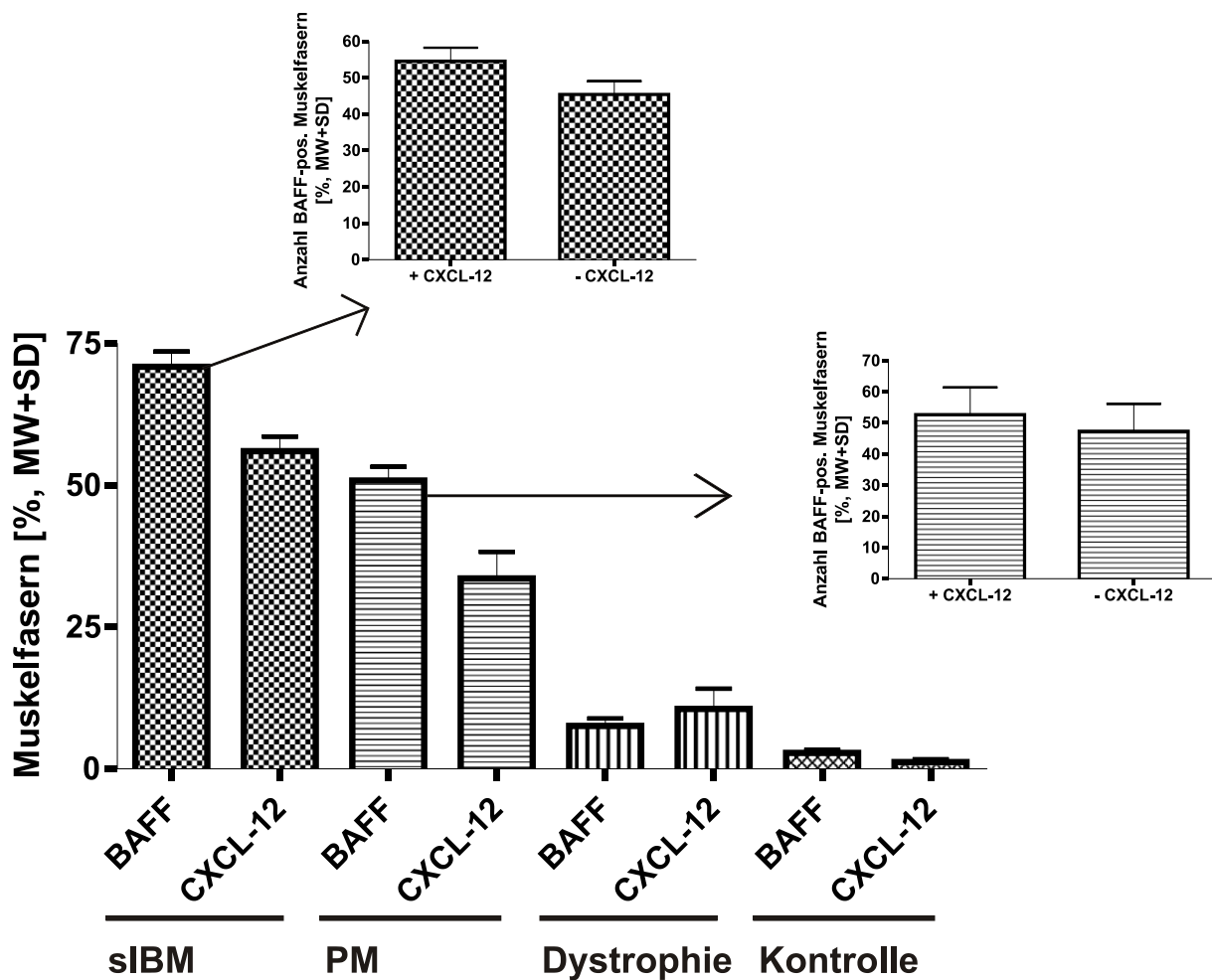


Abbildung 4.6: Quantitative Auswertung der Muskelfasern von immunhistochemischen Färbungen. Deutliche Überexpression von BAFF und CXCL-12 in Muskelbiopsien von Patienten mit sIBM und PM im Vergleich zu Dystrophien und Kontrollen. Etwa die Hälfte der für BAFF positiven Fasern bei der sIBM und PM waren auch für CXCL-12 positiv. Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung in Prozent. Pro Patient wurden zwischen 78 und 233 Muskelfasern ausgewertet; n=5 pro Erkrankungsgruppe.

Die quantitative Auswertung der Muskelfasern ergab eine Überexpression von BAFF ($70,88 \pm 6,01\%$ jeweils $MW \pm SD$) und CXCL-12 ($56 \pm 5,83\%$) in Muskelbiopsien von Patienten mit sIBM. $54,58 \pm 8,28\%$ der für BAFF positiven Fasern waren auch für CXCL-12 positiv. Einige der für BAFF und CXCL-12 positiven Fasern hatten Kontakt zu CD-20+ B-Zellen, jedoch waren insgesamt nur wenige B-Zellen in den Muskelbiopsieschnitten nachzuweisen. Einzelne Fasern waren dreifach positiv für BAFF, CXCL-12 und MHC-I.

Eine Überexpression der Marker BAFF und CXCL-12 konnte ebenso in Muskelbiopsien von Patienten mit Polymyositis gezeigt werden, hierbei ergaben sich für BAFF $50,81 \pm 5,5\%$ positive Fasern und für CXCL-12 waren es $33,6 \pm 10,4\%$ positive Fasern. $52,64 \pm 19,64\%$ der für BAFF positiven Fasern waren gleichzeitig positiv für CXCL-12. Auch in den Muskelbiopsieschnitten von Patienten mit Polymyositis ließen sich insgesamt nur wenige B-Zellen nachweisen, einige dieser Zellen hatten Kontakt zu BAFF und CXCL-12 positiven Muskelfasern.

In Muskeldystrophien zeigten $7,58 \pm 2,92\%$ der Muskelfasern immunhistochemisch eine Reaktion mit dem BAFF-Antikörper, CXCL-12-positive Fasern waren mit $10,6 \pm 7,89\%$ vorhanden. In den Kontrollmuskeln konnten $2,86 \pm 1,12\%$ für BAFF und $1,2 \pm 1,09\%$ für CXCL-12 positive Muskelfasern nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.6). Nachfolgend sind repräsentative immunhistochemische Färbungen von Biopsien und die quantitativen Grauwertuntersuchungen aufgeführt.

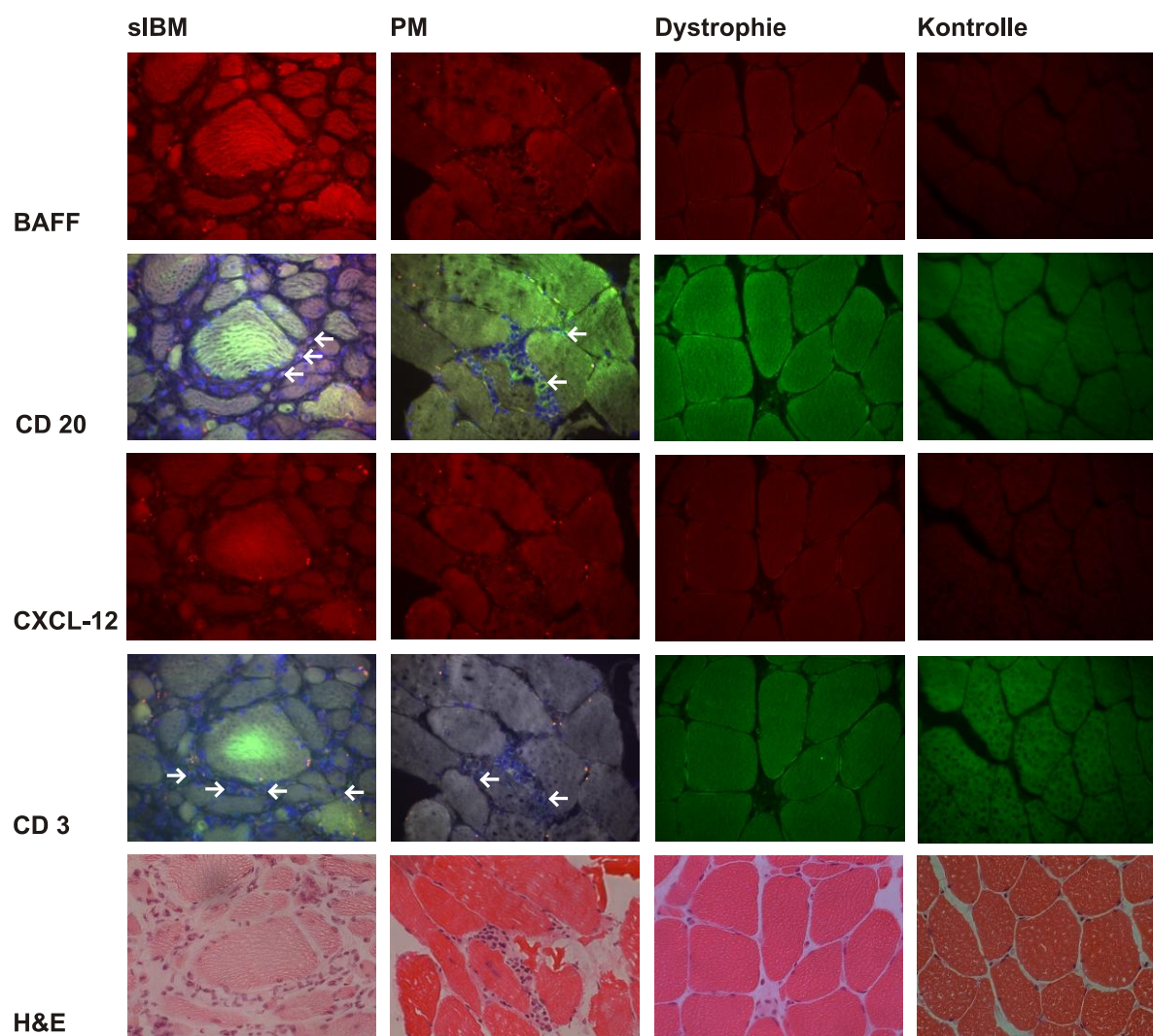


Abbildung 4.7: Immunhistochemische Doppelfärbungen serieller Muskelbiopsieschnitte von Patienten mit sIBM im Vergleich zu PM, Muskeldystrophie und Kontrolle.

Doppelfärbung von **BAFF (rot)** und **CD20 (grün)** mit Zellkerngegenfärbung **DAPI (blau)**, sowie **CXCL-12 (rot)** und **CD3 (grün)** mit Zellkerngegenfärbung, zudem **H&E-** Färbung. Bilder der verschiedenen Erkrankungsgruppen in Säulen untereinander angeordnet. Ausschnitte jeweils mit 40er Objektiv aufgenommen.

sIBM: Deutlich BAFF-positive Muskelfasern, Zell-Kontakt einer für BAFF positiven Muskelfaser mit CD20-positiven B-Zellen (siehe weiße Pfeile). Einzelne CXCL-12-positive Muskelfasern, T-Zell-Infiltration (siehe weiße Pfeile).

PM: BAFF-positive Muskelfasern mit Zellinfiltration, darunter auch CD20+ B-Zellen. Einzelne für CXCL-12 positive Muskelfasern. Weiße Pfeile zeigen auf CD3+ T-Zellen.

Dystrophie/Kontrolle: Kaum Signalanhebung detektierbar.

Insgesamt lassen sich deutliche Expressionsunterschiede von BAFF und CXCL-12 auf Proteinebene in Muskelbiopsien von Patienten mit sIBM und PM im Vergleich zu Kontrollmuskeln und Muskeldystrophien nachweisen (vgl. Abb. 4.7). Dies verdeutlicht auch die quantitative Grauwertanalyse insbesondere für BAFF (vgl. Abb. 4.8).

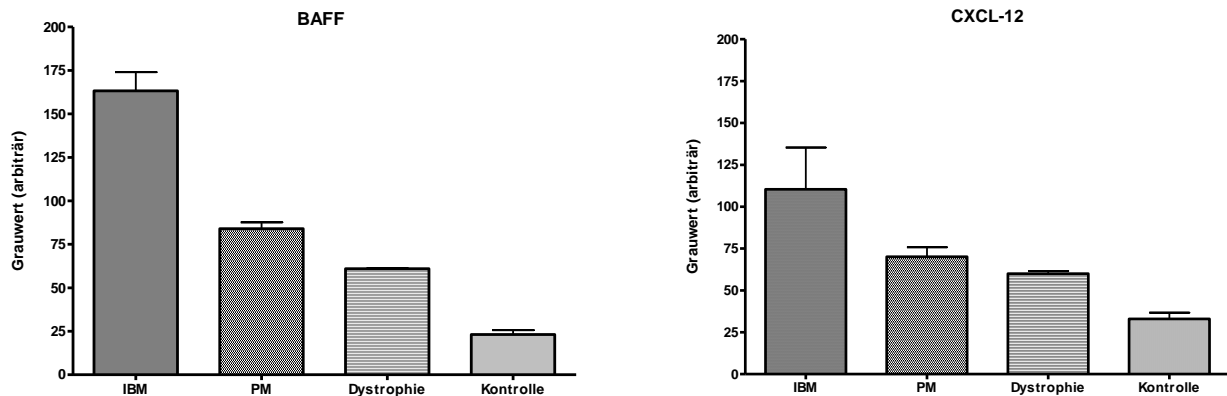


Abbildung 4.8: Quantitative Grauwertanalyse der immunhistochemischen Färbungen serieller Muskelbiopsieschnitte von je 5 Patienten mit sIBM, PM und Muskeldystrophien im Vergleich zu Kontrollen. Deutliche Expressionsunterschiede von BAFF und CXCL-12 in Muskelbiopsien von Patienten mit sIBM im Vergleich zu Kontrollen .

4.5 mRNA-Expression von BAFF, CXCL-12, APRIL und CXCL-13 in gesunden Muskelzellen nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen

Um funktionelle Aspekte in der Pathogenese der sIBM zu untersuchen, wurden In-Vitro-Experimente an humanen Muskelzellen durchgeführt. Für die Zellkultur-experimente wurden Myoblasten der Rhabdomyosarkoma-Zelllinie CCL136 und ausdifferenzierte Myotuben von nicht-myopathischen Kontrollen verwendet. Für 24 Stunden wurden die Zellkulturen unterschiedlichen Kombinationen der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ [300 U/ml], TNF- α [10 ng/ml] und IL-1 β [20 ng/ml] ausgesetzt. Im Anschluss erfolgte die Expressionsanalyse der Marker BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13.

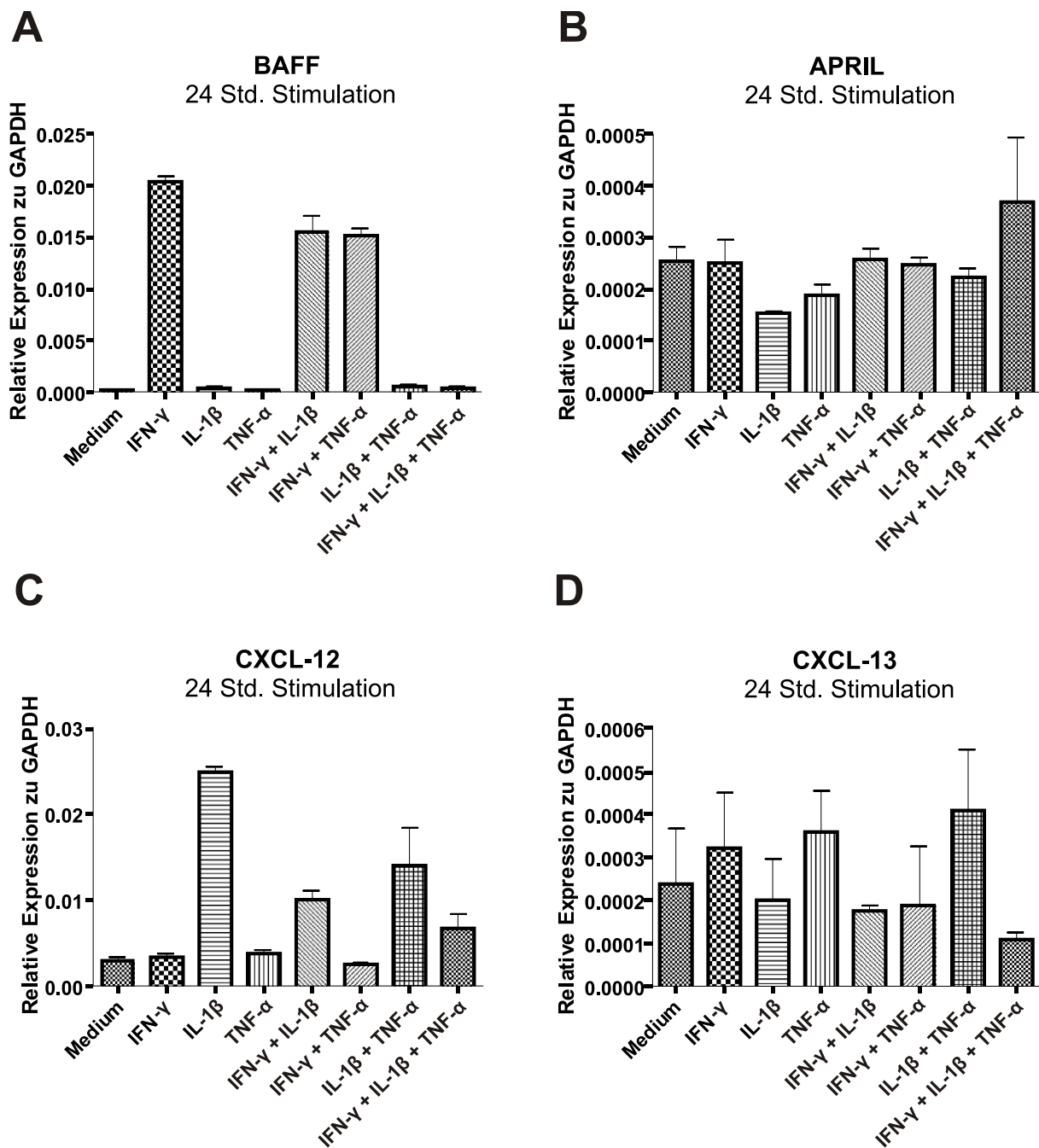


Abbildung 4.9: mRNA-Expression von BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 in humanen Muskelzellen nach Zytokinstimulation für 24 Stunden. (A) Insbesondere IFN- γ führt zur Induktion von BAFF; (B) Die Expression von APRIL bleibt nahezu unverändert nach Zytokinstimulation; (C) IL-1 β führt zur Hochregulation von CXCL-12; (D) CXCL-13 wird durch Stimulation nicht hochreguliert. Ergebnis mehrerer Zellexperimente mit Myotuben und Myoblasten. Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung.

Mittels Real-time-PCR wurde die relative Expression der jeweiligen Zielgene in Relation zu GAPDH gemessen und mit der relativen Expression in unbehandelten Muskelzellen verglichen. Es zeigte sich, dass die Inkubation von humanen Muskelzellen mit pro-inflammatorischen Zytokinen für 24 Stunden zu einer relevanten Hochregulation des B-Zell-assoziierten Markers BAFF und des entzündlichen Markers CXCL-12 führte. Hierbei erwies sich IFN- γ als stärkster Stimulator für die Expression von BAFF und IL-1 β hatte den stärksten stimulatorischen Effekt für die Hochregulation von CXCL-12. Die mRNA-Expression von APRIL und CXCL-13 blieb nach Zytokinstimulation hingegen nahezu unverändert (vgl. Abb. 4.9). Um die Hochregulation von BAFF und CXCL-12 im Zeitverlauf zu untersuchen, wurden die Experimente mit Stimulationszeiten von 12, 36 und 48 Stunden wiederholt.

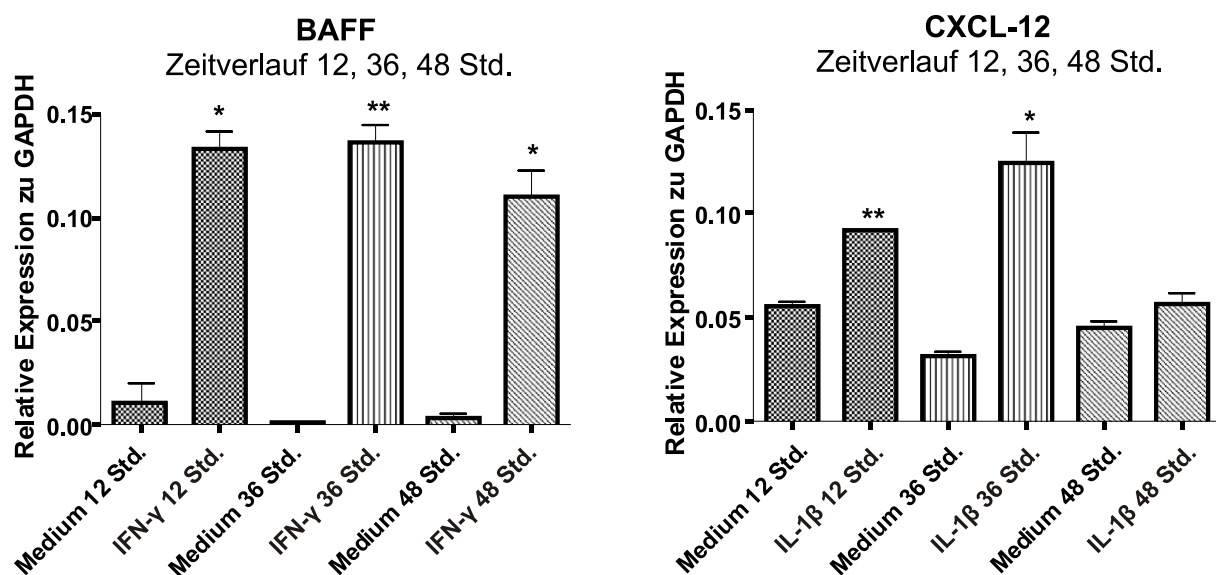


Abbildung 4.10: Zeitverlauf; mRNA-Expression von BAFF und CXCL-12 nach Zytokinstimulation für 12, 36 und 48 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. Das Maximum der mRNA-Expression von BAFF und CXCL-12 wird nach etwa 12 bis 36 Stunden Stimulation erreicht, danach fällt die mRNA-Konzentration wieder ab.

Bei der Messung der zu GAPDH relativen mRNA-Expression von BAFF und CXCL-12 im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich, dass schon eine Stimulation für nur 12 Stunden bereits zu einer signifikanten Induktion der beiden Marker führte. Nach

prolongierter Stimulation erreichte die mRNA-Expression von BAFF und CXCL-12 etwa um 36 Stunden ihr Maximum (vgl. Abb. 4.10).

4.6 Proteinexpression von BAFF und CXCL-12 in Myoblasten und humanen Myotuben nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen

Um den auf mRNA-Ebene gezeigten Effekt auch auf Proteinebene zu untersuchen, erfolgte die immunzytochemische Analyse der Marker BAFF und CXCL-12 im Zellkulturmodell primärer Myotuben und Myoblasten unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Dafür wurden die nicht-pathologischen Muskelzellkulturen über Zeiträume von 12, 24 und 48 Stunden mit Zytokinen versetzt. Hierbei wurden jeweils die für die mRNA-Expression von BAFF und CXCL-12 stärksten Stimulatoren IFN- γ bzw. IL-1 β verwendet. Anschließend wurde mit Antikörpern gegen BAFF und CXCL-12 gefärbt, um die Expression auf Proteinebene mittels fluoreszenter Immunzytochemie zu untersuchen. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop, zudem wurden Grauwertanalysen angefertigt. Nachfolgend abgebildet sind repräsentative immunzytochemische Färbungen von Myotuben, sowie die quantitative Grauwertanalyse von Myotuben und Myoblasten nach Zytokinstimulation.

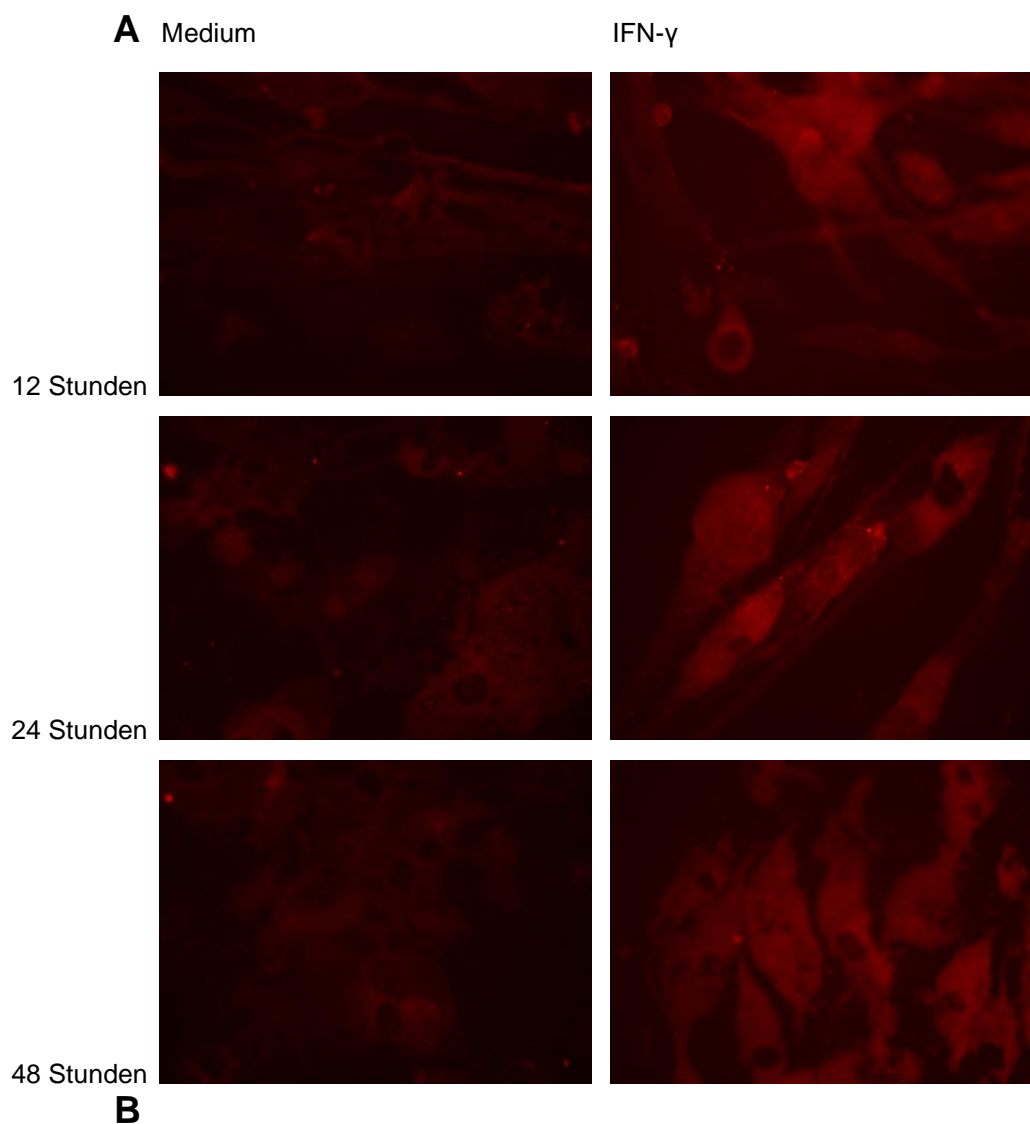


Abbildung 4.11: Proteinexpression von BAFF in nicht-pathologischen Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Zytokinstimulation mit IFN- γ [300 U/ml] für 12, 24 und 48 Stunden; n=3 pro Gruppe. **(A)** Repräsentative immunzytochemische Färbungen für Proteinexpression von BAFF in Myotuben nach Stimulation im Vergleich zu Kontrollkulturen. Die Aufnahmen wurden mit einem 40er Objektiv angefertigt; Filtereinstellung rot für Alexa 594. **(B)** Zugehörige quantitative Grauwertanalyse. Zu allen Zeitpunkten der Stimulation ist eine Hochregulation von BAFF zu erkennen.

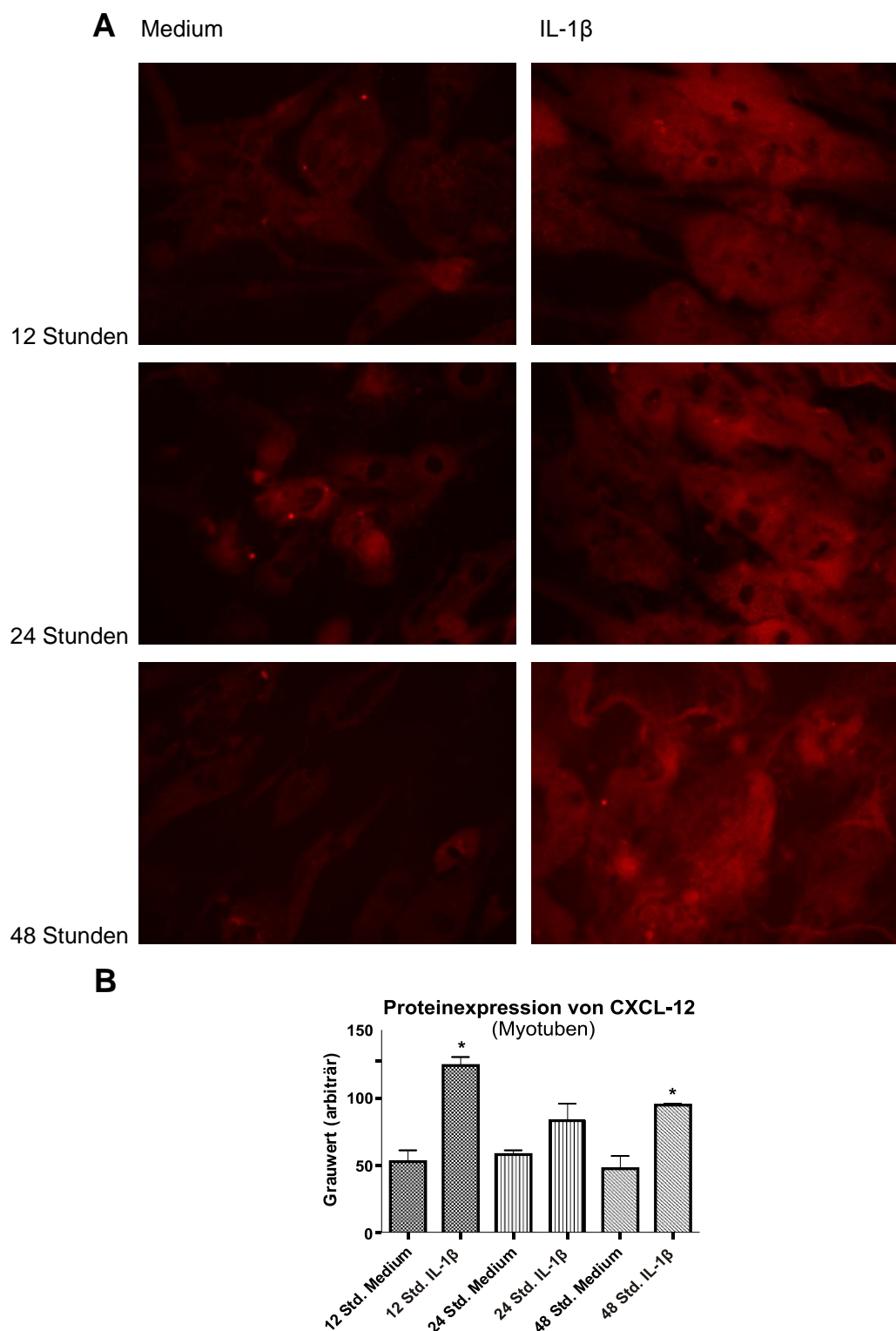


Abbildung 4.12: Proteinexpression von CXCL-12 in nicht-pathologischen Myotubenkulturen unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Zytokinstimulation mit IL-1 β [20 ng/ml] für 12, 24 und 48 Stunden; n=3 pro Gruppe. **(A)** Repräsentative immunzytochemische Färbungen für Proteinexpression von CXCL-12 in Myotuben nach Stimulation im Vergleich zu Kontrollkulturen. Die Aufnahmen wurden mit einem 40er Objektiv angefertigt; Filtereinstellung rot für Alexa 594. **(B)** Zugehörige quantitative Grauwertanalyse. Es zeigte sich zu allen Zeitpunkten eine erhöhte Proteinexpression von CXCL-12.

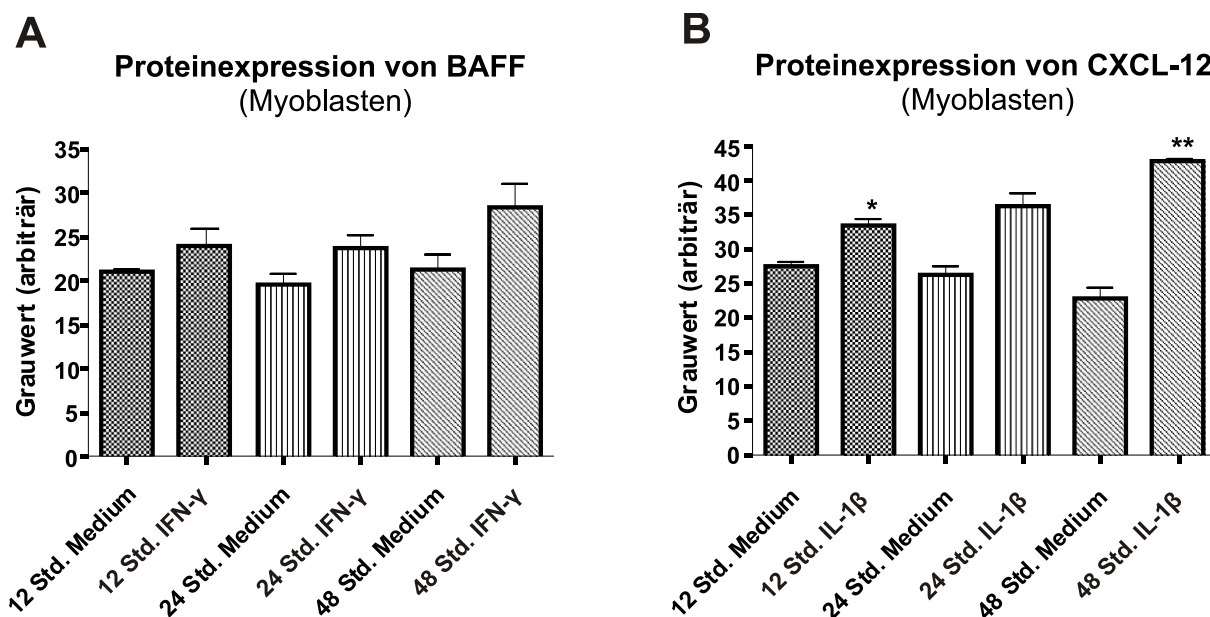


Abbildung 4.13: Proteinexpression von BAFF und CXCL-12 in Myoblasten nach Stimulation mit Zytokinen über 12, 24 und 48 Stunden. Quantitative Grauwertanalyse. **(A)** Proteinexpression von BAFF ist zu allen Zeitpunkten der Stimulation im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht. **(B)** CXCL-12 ist bereits nach 12 Stunden Stimulation auf Proteinebene erhöht exprimiert.

Die Exposition von nicht-pathologischen Myotubenkulturen mit IFN- γ bzw. IL-1 β über 12, 24 und 48 Stunden bewirkte im In-Vitro-Modell bereits nach 12 Stunden die Induktion der Proteinexpression von BAFF bzw. CXCL-12 (vgl. Abb. 4.11 A und 4.12 A), nach 48 Stunden zeigte sich eine deutliche Überexpression der beiden Marker im Vergleich zu unbehandelten Myotuben. Die im Anschluss erfolgte statistische Grauwertuntersuchung der Proteinexpression von BAFF und CXCL-12 verdeutlichte eine signifikante ($P \leq 0,05$) Hochregulation (vgl. Abb. 4.11 B und 4.12 B). Die Experimente wurden unter denselben Bedingungen auch mit Myoblasten der Rhabdomyosarkoma-Zelllinie CCL136 durchgeführt. Von diesen Experimenten sind nur die Grauwertanalysen der immunzytochemischen Bilder dargestellt. In Myoblasten zeichnete sich die Induktion von BAFF auf Proteinebene nicht so deutlich ab wie zuvor in den Myotuben. In der Grauwertanalyse war die Proteinexpression von BAFF zu allen Zeitpunkten der Stimulation mit IFN- γ nur leicht erhöht im Vergleich zu unbehandelten Myoblasten (vgl. Abb. 4.13 A). Die Proteinexpression von CXCL-12 hingegen war auch in Myoblasten nach Stimulation mit IL-1 β deutlich erhöht. Mittels

Grauwertuntersuchung ergab sich eine signifikante ($P \leq 0,05$ und $P \leq 0,01$) Hochregulation (vgl. Abb. 4.16 B).

5 Diskussion

Die Pathogenese der sIBM ist durch das Nebeneinander entzündlicher und degenerativer Mechanismen gekennzeichnet [Dalakas 2006]. Histopathologisch finden sich neben degenerativen Komponenten wie der Expression von β -Amyloid und seinem Vorläufermolekül APP autoimmun-inflammatorische Charakteristika wie die Hochregulation pro-inflammatorischer Marker und der Nachweis entzündlicher Infiltrate. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass es sich bei den infiltrierenden Zellen hauptsächlich um zytotoxische CD8+ T-Zellen handelt [Müntzing et al. 2003]. Neben den T-Zellen sind aber auch andere Immunzellen im Muskel von Patienten mit sIBM nachzuweisen. Neuere Daten sprechen für eine klonale Expansion von B-Zellen und dafür, dass B-Zell-Mechanismen bei der Erkrankung der sIBM eine Rolle spielen könnten [Bradshaw et al. 2007]. Diese Daten lassen vermuten, dass die Pathogenese inflammatorischer Myopathien auch durch eine Antigen-spezifische B-Zell-Antwort gekennzeichnet ist und unterstreichen die Notwendigkeit, die bisherige Kenntnis, dass es sich bei den entzündlichen Mechanismen in sIBM und PM vorwiegend um T-Zell-vermittelte Prozesse handelt, zu überprüfen. Es ist bisher noch unklar, inwieweit Muskelfasern selbst an der Aktivierung und Rekrutierung von B-Zellen beteiligt sind. In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung von B-Zell-Mechanismen in der Pathogenese der sporadischen Einschlusskörpermyositis relevante Marker, die an der Stimulation von B-Zellen beteiligt sind, nämlich BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13, *ex vivo* und *in vitro* analysiert. Um die Ergebnisse im Kontext von muskulären Erkrankungen zu bewerten, wurde die sIBM der Polymyositis, Muskeldystrophien sowie den nicht-myopathisch veränderten Kontrollen gegenübergestellt.

Die quantitative RT-PCR ergab, dass die Marker BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 in Muskelbiopsien von Patienten mit sIBM und Polymyositis im Vergleich zu Muskeldystrophien und zu nicht-pathologischen Kontrollen erhöht exprimiert werden. Für die Expression von BAFF, APRIL und CXCL-13 ergaben sich dabei signifikante Werte im Vergleich zur Kontrolle. Zudem konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von BAFF und CXCL-12 in Muskelbiopsien von sIBM-Patienten signifikant korreliert. Die auf mRNA-Ebene beobachteten Expressionsunterschiede

von B-Zell-relevanten Markern stützen die Hypothese, dass B-Zell-Mechanismen bei der Pathogenese einer chronischen Myositis wie in der sIBM eine Rolle spielen können. Über verschiedene stimulatorische Moleküle scheinen die Muskelfasern selbst an der Rekrutierung und Aktivierung von B-Zellen beteiligt zu sein. Durch die erhöhte Expression der in dieser Arbeit untersuchten Marker wie auch durch die bereits bekannte gesteigerte Expression einiger Zytokine [Tews und Goebel 1996] könnten Muskelfasern selbst entzündliche Folgekaskaden mit antreiben und die zelluläre Autoimmunantwort beeinflussen. Dieser Prozess scheint jedoch nicht allein spezifisch für die Pathogenese der sIBM zu sein, da auch in den Muskelbiopsien von Patienten mit Polymyositis eine gesteigerte Expression von BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 nachzuweisen war. Diese Daten stehen im Einklang mit der bisherigen Kenntnis, dass die Entzündungsprozesse der idiopathisch inflammatorischen Myopathien sIBM und PM sehr ähnlich ablaufen.

Die *in vitro* beobachteten Expressionsunterschiede von BAFF und CXCL-12 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nach Stimulation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IFN- γ und IL-1 β lieferten die Grundlage für die immunhistochemischen Färbungen von Muskelbiopsieschnitten mit fluoreszenten AK gegen BAFF und CXCL-12. In Serie wurden Doppelfärbungen angefertigt, zum einen mit BAFF- und CD20-Antikörpern, zum anderen mit CXCL-12- und CD3-Antikörpern und zum Teil auch mit Antikörpern gegen MHC-I und MHC-II. Es konnte gezeigt werden, dass BAFF und CXCL-12 auch auf Proteinebene in Muskelbiopsien von Patienten mit sIBM und PM erhöht exprimiert werden. Insgesamt gab es einen deutlichen Expressionsunterschied im Vergleich zur Kontrolle. Ein Großteil der für BAFF positiven Fasern war ebenso positiv für CXCL-12. Zudem konnten auch einige dreifach positive Muskelfasern für BAFF, CXCL-12 und MHC-I nachgewiesen werden. In den Muskelbiopsieschnitten waren insgesamt nur wenige B-Zellen vorhanden. Einzelne B-Zellen hatten Kontakt zu BAFF- und CXCL-12-positiven Muskelfasern. Zusammenfassend stützen auch die immunhistochemischen Doppelfärbungen von Muskelbiopsien die These, dass B-Zell-Mechanismen an der Pathogenese der sIBM beteiligt sind. Um deutlichere Aussagen bezüglich der Ko-Lokalisation machen zu können, müsste die Anzahl der Färbungen jedoch gesteigert werden. Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit wurden Muskelbiopsieschnitte von nur 5 Patienten eingefärbt. Möglicherweise wären in anderen sIBM-Muskelbiopsien

B-Zellen in größerer Zahl vorhanden. Es gibt verschiedene Aspekte, die Einfluss auf den Status der Biopsie haben können. Dazu gehören beispielsweise die Krankheitsaktivität zum Zeitpunkt der Biopsie und die insgesamt bereits unterschiedlich lang andauernde Krankheit. Auch das unterschiedliche Geschlecht könnte Einfluss auf den Status der Biopsie haben. Noch gibt es zwar keine genauen Kenntnisse, warum mehr Männer als Frauen von der Erkrankung der sIBM betroffen sind, der Krankheitsverlauf scheint jedoch zum Teil schwerwiegender. Es gibt Hinweise, dass der Fortschritt der Erkrankung bei männlichen Patienten und bei zum Zeitpunkt der Diagnose bereits älteren Patienten rascher abläuft [Peng et al. 2000; Badrising et al. 2005; Benveniste et al. 2011].

Um funktionelle Aspekte in der Pathogenese der sIBM zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit In-Vitro-Experimente mit gesunden Muskelzellen durchgeführt. Mittels RT-PCR und Immunzytochemie wurden die Marker BAFF, APRIL, CXCL-12 und CXCL-13 nach Exposition zu TNF- α , IFN- γ , IL-1 β oder Kombinationen dieser Zytokine im Vergleich zur Kontrolle analysiert. Über diese mRNA- und Proteinexpressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass Muskelzellen unter entzündlichen Bedingungen die B-Zell-relevanten Marker BAFF und CXCL-12 überexprimieren. Bereits nach 12 und 36 Stunden Stimulation konnte im Vergleich zu unbehandelten Muskelzellen eine signifikante Überexpression auf mRNA-Ebene detektiert werden. Auch auf Proteinebene ließ sich dieser Effekt nachweisen. Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass Muskelzellen unter pro-inflammatorischen Bedingungen selbst in der Lage sind, B-Zell-stimulierende Marker zu produzieren. Für die Produktion einiger Zytokine konnte dies bereits in früheren In-Vitro-Studien gezeigt werden [Nagaraju et al. 1998; Nagaraju 2001; Roy et al. 1991]. In der vorliegenden Arbeit waren IFN- γ und IL-1 β die stärksten Stimulatoren für die Produktion von BAFF und CXCL-12. Diese beiden Zytokine scheinen eine wichtige pathophysiologische Rolle in entzündlichen Myopathien zu spielen. Über verschiedene Wege können diese zur Schädigung von Muskelfasern führen. Zum einen konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass IFN- γ und IL-1 β zusammen mit weiteren Zytokinen daran beteiligt sind, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen in den Muskel zu locken [Raju et al. 2003]. Zum anderen lassen die vorliegenden Daten vermuten, dass IFN- γ und IL-1 β über die Stimulation der Expression von BAFF und CXCL-12 auch an der Invasion und Expansion von B-Zellen sowie an der Co-

Stimulation von T-Zellen beteiligt sind. Zudem kann die chronisch entzündliche Umgebung direkt zu massiven Schädigungen der Muskelfasern führen, dies konnte bereits für IL-1 β gezeigt werden [Broussard et al. 2004]. IL-1 β scheint nicht nur im Rahmen der Entzündungsprozesse in der sIBM eine wichtige Rolle zu spielen, sondern fungiert möglicherweise auch als ein Bindeglied zwischen Entzündung und Degeneration. *In vitro* konnte vor wenigen Jahren nachgewiesen werden, dass IL-1 β die β -Amyloid-Akkumulation im Muskel fördern kann [Schmidt et al. 2008].

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Expression von BAFF und CXCL-12 auch die Expression von APRIL und CXCL-13 *in vitro* untersucht. Diese blieb in nicht-pathologischen Muskelzellen durch die Stimulation mit verschiedenen Zytokinen im Vergleich zu Kontrollen unbeeinflusst. Eine mögliche Erklärung für einen ausbleibenden Effekt könnte die eingesetzte Zytokinkonzentration sein. Obwohl diese zwar den physiologisch vorkommenden Mengen an Zytokinen im entzündlichen Milieu entspricht, wäre dosisabhängig möglicherweise ein minimaler Unterschied nachzuweisen. Auch könnten andere stimulatorische Moleküle außerhalb der in dieser Arbeit getesteten Zytokine für eine gesteigerte Expression von APRIL und CXCL-13 in Muskelzellen verantwortlich sein. Eine weitere Erklärung wäre jedoch, dass APRIL und CXCL-13 im Gegensatz zu BAFF und CXCL-12 nicht von den Muskelzellen selbst produziert und sezerniert werden können. Dies entspräche den bisher aus der Literatur bekannten Daten, dass APRIL von Immunzellen und CXCL-13 zudem auch von Endothelzellen oder Fibroblasten synthetisiert und ausgeschüttet werden [Zlotnik und Yoshie 2000]. Durch die vorliegenden Daten ist nicht auszuschließen, dass APRIL und CXCL-13 in der Pathogenese der sIBM eine Rolle spielen. Im Verlauf der entzündlichen Prozesse könnten APRIL und CXCL-13 Teil des sehr komplexen inflammatorischen Gefüges sein und somit auch an der B-Zell-Regulation beteiligt sein. Der funktionelle Aspekt, inwieweit und durch welche Faktoren diese Marker beeinflusst werden, bleibt jedoch unklar.

Bis heute ist es noch nicht gelungen, eine effektive Behandlung für die sIBM zu entwickeln. Es gibt kein durch Studien belegtes Therapieschema und häufig erfolgt ein individueller Therapieversuch im Off-label-Verfahren. Die unspezifische Immunsuppression mit Kortikosteroiden bleibt anders als bei Polymyositis-Patienten in der Regel erfolglos. Ein Effekt immunsuppressiver Therapie kann nur bei einzelnen sIBM-Patienten und zumeist nur für einen begrenzten Zeitraum beobachtet werden [Griggs 2006]. Auch eine T-Zell-Depletion mit dem humanisierten T-Zell-Antikörper Alemtuzumab bewirkte in einer Studie von 2009 nur bei einigen Patienten eine Verlangsamung des Erkrankungsfortschritts [Dalakas et al. 2009]. Warum immunmodulatorische bzw. immunsuppressive Therapieansätze nur unzureichende Effekte bringen, ist bisher unklar. Dass diese Therapien nur wenig Wirkung erzielen, sollte jedoch nicht zu der Schlussfolgerung führen, dass Inflammation keine primäre Rolle in der Erkrankung spielt. Der Beginn ist schleichend und langsam, bis zur Diagnosestellung und dem Einleiten einer Therapie vergeht meist einige Zeit, sodass die Degeneration möglicherweise schon einen großen Teil der Muskulatur irreversibel betrifft. Ein früher Therapiezeitpunkt könnte daher von grundlegender Bedeutung für die Wirksamkeit verschiedener Immuntherapien sein. Die frühe Diagnosestellung der sIBM wäre aus dieser Sicht sehr bedeutend, zudem eine frühe Differenzierung zur Polymyositis, um Fehldiagnosen, die wichtige Zeit kosten, zu verhindern. Eine weitere Ursache für die bisher unzureichende therapeutische Wirkung der Behandlungskonzepte könnte sein, dass es zu einer Produktion proinflammatorischer Mediatoren durch die Muskelfasern selbst kommt und Immunsuppressiva, die vorwiegend primär auf Immunzellen abzielen, daher unzureichend wirksam sind.

Durch die voranschreitende Forschung konnten bisher einzelne Aspekte in der Pathogenese der sIBM verstanden werden, ein einheitliches Bild bzw. der Gesamtzusammenhang ist bisher jedoch nur unzureichend bekannt. Entzündung und Degeneration scheinen eng miteinander verzahnt zu sein und sich gegenseitig zu bedingen. Es scheint ein Kreislauf zu entstehen, der nur schwer zu durchbrechen ist. Um eine effektive Therapie in der sIBM zu entwickeln, ist die Kenntnis, inwieweit diese beiden Komponenten zusammenhängen und welche die primäre Rolle in der Krankheitsentstehung hat, unabdingbar. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten fördern das Verständnis der Pathologie der sIBM und stützen die Hypothese, dass B-Zell-assoziierte Pathomechanismen bei der sIBM von Bedeutung sind und ein neues

Ziel für zukünftige Therapiestrategien bei der sIBM darstellen könnten. Die Daten stehen im Einklang mit neuesten Ergebnissen zweier Arbeitsgruppen, die erstmals einen für die sIBM spezifischen Antikörper Mupp44/cN1A identifiziert haben und somit ebenfalls die Bedeutung B-Zell-assoziiierter Mechanismen in der Pathogenese der sIBM unterstreichen [Pruijn et al. 2013; Greenberg et al. 2013]. Eine Reproduktion mit größeren Patientenzahlen bleibt aktuell jedoch noch abzuwarten. Gerade weil B-Zellen auf sehr vielfältige Art und Weise an komplexen Autoimmunprozessen beteiligt sein können, dazu zählen die Antikörperproduktion, die Co-Stimulation von T-Zellen, die Koordination von T-Zellfunktionen und die Zytokinproduktion, könnten B-Zellen bzw. Moleküle, die B-Zellen stimulieren, ein attraktives Ziel bei der Entwicklung neuer Therapien sein. Die Daten der vorliegenden Arbeit bekräftigen die Erprobung einer BAFF- oder CXCL-12-Blockade in der Therapie der sIBM. Gezielte Immuntherapie mit spezifischen Antikörpern könnte ergänzend oder alternativ in der Therapie eingesetzt werden. Ein möglicher Ansatz wäre zum Beispiel die Kombination von B-Zell-Depletion via Rituximab, einem monoklonalen Antikörper gegen CD20+ B-Zellen, mit einem BAFF-Antagonisten, um eine länger anhaltende B-Zell-Depletion zu erhalten und um den Wiederanstieg von autoreaktiven B-Zellen zu blockieren. Bei 8 von 10 Patienten mit Polymyositis oder Dermatomyositis, die nur schwach auf eine Kortison-Therapie ansprachen, konnte beispielsweise durch die Gabe von Rituximab eine Steigerung der Muskelkraft erreicht werden [Noss et al. 2006]. Die gezielte therapeutische Blockade insbesondere von BAFF ist aktuell von großem Interesse, da dieses Molekül im Gewebe von Patienten mit verschiedensten Autoimmunerkrankungen hochreguliert ist. Wirkstoffe, die auf BAFF abzielen, sind beispielsweise Belimumab, ein humanisierter Antikörper, der die Bindung von BAFF an die Rezeptoren auf B-Zellen blockiert und somit Einfluss auf das Überleben von B-Zellen - einschließlich der autoreaktiven B-Zellen - nimmt und die Differenzierung von B-Zellen in die Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen reduziert und der BAFF-Antagonist AMG G23. Im Rahmen der Therapie von rheumatoider Arthritis und systemischem Lupus erythematodes befinden sich schon einige dieser Substanzen in Phase I-II-Studien [Hasler und Zouali 2006; Browning 2006]. Mithilfe eines Mausmodells für systemischen Lupus erythematodes konnte bereits gezeigt werden, dass die Blockade von BAFF-Rezeptoren nicht nur die Antikörper-Titer senkte, sondern auch das Überleben der Tiere positiv beeinflusste [Stohl 2004]. Weitere Ziele der Immuntherapie neben BAFF und CXCL-12 könnten auch IFN- γ und IL-1 β

sein, die, wie in dieser Arbeit gezeigt, Einfluss auf die Expression von BAFF und CXCL-12 haben und darüber hinaus für einige Folgekaskaden in der Pathogenese der sIBM verantwortlich sind. Der Einsatz von Anakinra, einem IL-1-Rezeptor Antagonisten, der für die Therapie der rheumatoiden Arthritis erprobt wurde, könnte für die sIBM-Therapie diskutiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Therapie der sIBM bis heute eine große Herausforderung darstellt. Ein multimodaler Therapieansatz zu einem frühen Zeitpunkt scheint ein wesentlicher Aspekt in der Behandlung der sIBM zu sein. Dabei könnte die gezielte Immuntherapie in Zukunft von besonderer Bedeutung sein. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten bekräftigen diese These und könnten helfen, neue Behandlungskonzepte zu entwickeln.

6 Zusammenfassung

Die sporadische Einschlusskörpermyositis ist die am häufigsten erworbene Myopathie jenseits des 50. Lebensjahres. Chronisch progredient führt die Skelettmuskelerkrankung proximal und distal zu Atrophie und Muskelschwäche. Die Patienten werden innerhalb von 5-20 Jahren rollstuhlpflichtig. Die Pathogenese der sIBM beinhaltet degenerative und entzündliche Komponenten, deren Zusammenhang bis heute unzureichend verstanden ist. Histologisch charakteristisch sind die Akkumulation von aberranten Proteinen wie β -Amyloid und seinem Vorläufermolekül APP und eine ausgeprägte entzündliche Reaktion der Muskelfasern, die selbst zur Invasion von Entzündungszellen, besonders von zytotoxischen T-Zellen, beiträgt. Auch B-Zellen könnten eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der sIBM spielen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine effektiven Behandlungsmöglichkeiten für diese Muskelerkrankung.

Diese Arbeit hatte zum Ziel, B-Zell-assoziierte Mechanismen in der Pathogenese der sporadischen Einschlusskörpermyositis zu untersuchen und diese im Kontext von anderen Muskelerkrankungen zu bewerten.

Dazu wurden die mRNA- und Proteinexpression relevanter Marker, die an Aktivierung und Rekrutierung von B-Zellen beteiligt sind, untersucht. Die sIBM wurde der Polymyositis, den Muskeldystrophien und nicht-myopathisch veränderten Kontrollen gegenübergestellt. Über die mRNA-Expressionsanalyse von Muskelbiopsien konnte gezeigt werden, dass BAFF (*B-cell-activating factor*), APRIL (*a proliferation-including ligand*) und die Chemokine CXCL-12 und CXCL-13 vor allem in der Pathogenese der sIBM, aber auch der Polymyositis im Vergleich zu Muskeldystrophien und Kontrollen eine Rolle spielen. Die mittlere mRNA-Expression von BAFF und APRIL war bei der sIBM und der PM im Vergleich zu nicht-myopathischen Kontrollen signifikant erhöht, in Muskelbiopsien von Patienten mit Dystrophie konnten BAFF und APRIL auch erhöht detektiert werden, im Unterschied zur Kontrolle jedoch nicht signifikant. Die mRNA-Expression von CXCL-12 zeigte sich bei allen Erkrankungsgruppen im Vergleich zur Kontrolle erhöht, es ergaben sich hierbei keine Signifikanzen. Die CXCL-13-Expression in der sIBM und PM war im Vergleich zu Kontrollen und Dystrophien signifikant erhöht.

Auf Proteinebene konnte immunhistochemisch mittels serieller Doppelfärbungen für BAFF und CXCL-12 in Muskelbiopsien von Patienten mit sIBM und PM im Vergleich zu Muskeldystrophien und Kontrollen eine gesteigerte Expression dieser Marker gezeigt werden. Bezüglich Ko-Lokalisation wurde deutlich, dass ein Großteil der für BAFF positiven Fasern auch für CXCL-12 positiv war. Einzelne B-Zellen hatten Kontakt zu BAFF- und CXCL-12-positiven Muskelfasern. Um funktionelle Aspekte in der Pathogenese der sIBM zu untersuchen, wurden In-Vitro-Experimente mit gesunden Muskelzellen durchgeführt. Hierbei konnte über mRNA- sowie Protein-expressionsanalyse gezeigt werden, dass Muskelzellen im pro-inflammatorischen Milieu die Marker BAFF und CXCL-12 überexprimieren. IFN- γ zeigte sich als stärkster Stimulator für die mRNA-Expression von BAFF, daneben hatte IL-1 β den stärksten stimulatorischen Effekt auf die Expression von CXCL-12.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass neben T-Zell-Mechanismen auch B-Zell-assoziierte Pathomechanismen bei der chronischen Myositis wie der sIBM eine Rolle spielen können. Die Daten legen nahe, dass die Muskelfasern selbst an der Rekrutierung von B-Zellen beteiligt sein könnten und stützen die Hypothese, dass B-Zell-assoziierte Mechanismen bei der sIBM ein neues Ziel für zukünftige Therapiestrategien in der Behandlung der sIBM darstellen können.

Die gewonnenen Daten fördern das Verständnis der Pathologie der sIBM und können helfen, neue Behandlungsmöglichkeiten gegen diese schwere Erkrankung zu entwickeln.

7 Literaturverzeichnis

- 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
- Amemiya K (2000): Clonal restriction of T-cell receptor expression by infiltrating lymphocytes in inclusion body myositis persists over time: Studies in repeated muscle biopsies. *Brain* 123, 2030–2039
- 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
- Askanas V, Engel WK (2007): Inclusion-body myositis, a multifactorial muscle disease associated with aging: current concepts of pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 19, 550–559
- Badr G, Borhis G, Lefevre EA, Chaoul N, Deshayes F, Dessirier V, Lapree G, Tsapis A, Richard Y (2008): BAFF enhances chemotaxis of primary human B cells: a particular synergy between BAFF and CXCL13 on memory B cells. *Blood* 111, 2744–2754
- Badrising UA, Maat-Schieman MLC, van Houwelingen JC, van Doorn PA, van Duinen SG, van Engelen BGM, Faber CG, Hoogendijk JE, de Jager AE, Koehler PJ et al. (2005): Inclusion body myositis. Clinical features and clinical course of the disease in 64 patients. *J Neurol* 252, 1448–1454
- Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL, Tougne C, Rochat AF, Bossen C, Schneider P, Huard B, Lambert PH, Siegrist CA (2008): APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* 111, 2755–2764
- Bender A, Behrens L, Engel AG, Hohlfeld R (1998): T-cell heterogeneity in muscle lesions of inclusion body myositis. *J Neuroimmunol* 84, 86–91
- Benveniste O, Squier W, Boyer O, Hilton-Jones D, Herson S (2004): [Pathogenesis of primary inflammatory myopathies]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983 33, 1444–1450
- Benveniste O, Guiguet M, Freebody J, Dubourg O, Squier W, Maisonobe T, Stojkovic T, Leite MI, Allenbach Y, Herson S et al. (2011): Long-term observational study of sporadic inclusion body myositis. *Brain* 134, 3176–3184

- Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J (2002): THIS IS A PROOF. Trends Biochem Sci 27
- Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, Ingold K, Willen L, Dobles M, Scott ML, Maquelin A, Belnoue E, Siegrist CA et al. (2007): TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. Blood 111, 1004–1012
- Bradshaw EM, Orihuela A, McArdel SL, Salajegheh M, Amato AA, Hafler DA, Greenberg SA, O'Connor KC (2007): A local antigen-driven humoral response is present in the inflammatory myopathies. J Immunol Baltim Md 1950 178, 547–556
- Broussard SR, McCusker RH, Novakofski JE, Strle K, Shen WH, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW (2004): IL-1 β 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
- Browning JL (2006): B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. Nat Rev Drug Discov 5, 564–576
- Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S (2010): Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. Lancet Neurol 9, 177
- Carpenter S, Karpati G, Heller I, Eisen A (1978): Inclusion body myositis: a distinct variety of idiopathic inflammatory myopathy. Neurology 28, 8–17
- Chou S (1967): Myxovirus-Like Structures in a Case of Human Chronic Polymyositis. Science 158, 1453–1455
- Cronin ME, Plotz PH (1990): Idiopathic inflammatory myopathies. Rheum Dis Clin North Am 16, 655–665
- Dalakas MC (1992): Clinical, immunopathologic, and therapeutic considerations of inflammatory myopathies. Clin Neuropharmacol 15, 327–351
- Dalakas MC (1995): Immunopathogenesis of inflammatory myopathies. Ann Neurol 37, 74–86
- Dalakas MC (2002): Muscle biopsy findings in inflammatory myopathies. Rheum Dis Clin North Am 28, 779–798

- Dalakas MC (2006a): Mechanisms of Disease: signaling pathways and immunobiology of inflammatory myopathies. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2, 219–227
- Dalakas MC (2006b): Sporadic inclusion body myositis—diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 437–447
- Dalakas MC (2011): Review: An update on inflammatory and autoimmune myopathies. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 37, 226–242
- Dalakas MC, Hohlfeld R (2003): Polymyositis and dermatomyositis. *The Lancet* 362, 971–982
- Dalakas MC, Sonies B, Dambrosia J, Sekul E, Cupler E, Sivakumar K (1997): Treatment of inclusion-body myositis with IVIg: a double-blind, placebo-controlled study. *Neurology* 48, 712–716
- Dalakas MC et al. (2009): Effect of Alemtuzumab (CAMPATH 1-H) in patients with inclusion-body myositis. *Brain* 132, 1536–1544
- De Bleecker JL, De Paepe B, Vanwalleghem IE, Schröder JM (2002): Differential expression of chemokines in inflammatory myopathies. *Neurology* 58, 1779–1785
- De Paepe B, Creus KK, De Bleecker JL (2009): Role of cytokines and chemokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 21, 610–616
- Deconinck N, Dan B (2007): Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. *Pediatr Neurol* 36, 1–7
- Dillon SR, Gross JA, Ansell SM, Novak AJ (2006): An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 5, 235–246
- Emery AE (1998): The muscular dystrophies. *Bmj* 317, 991–995
- Emslie-Smith AM, Arahata K, Engel AG (1989): Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies. *Hum Pathol* 20, 224–231
- Engel WK, Askanas V (2006): Inclusion-body myositis: clinical, diagnostic, and pathologic aspects. *Neurology* 66, S20–29
- Ervasti JM, Campbell KP (1993): A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122, 809–823

- Gowers WR (1879): Pseudo-hypertrophic muscular paralysis. A clinical lecture. London: J&A, Churchill
- Greenberg SA et al. (2013): Cytosolic 5'-Nucleotidase 1A autoimmunity in sporadic inclusion body myositis. *Ann Neurol* 73, 408-418
- Griggs RC (2006): The current status of treatment for inclusion-body myositis. *Neurology* 66, S30–32
- 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
- Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT (1998): A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 391, 799–803
- Hahne M, Kataoka T, Schröter M, Hofmann K, Irmeler M, Bodmer JL, Schneider P, Bornand T, Holler N, French LE (1998): APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med* 188, 1185–1190
- Hasler P, Zouali M (2006): B lymphocytes as therapeutic targets in systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Ther Targets* 10, 803–815
- Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM (1992): Dystrophin: the protein product of the Duchene muscular dystrophy locus. 1987. *Biotechnol Read Mass* 24, 457–466
- Joffe MM, Love LA, Leff RL, Fraser DD, Targoff IN, Hicks JE, Plotz, PH, Miller FW (1993): Drug therapy of the idiopathic inflammatory myopathies: predictors of response to prednisone, azathioprine, and methotrexate and a comparison of their efficacy. *Am J Med* 94, 379–387
- Jonsson MV, Szodoray P, Jellestad S, Jonsson R, Skarstein K (2005): Association Between Circulating Levels of the Novel TNF Family Members APRIL and BAFF and Lymphoid Organization in Primary Sjögren's Syndrome. *J Clin Immunol* 25, 189–201
- Julien J, Vital C, Vallat JM, Lagueny A, Sapina D (1982): Inclusion body myositis. Clinical, biological and ultrastructural study. *J Neurol Sci* 55, 15–24
- Kelly K, Manos E, Jensen G, Nadauld L, Jones DA (2000): APRIL/TRDL-1, a tumor necrosis factor-like ligand, stimulates cell death. *Cancer Res* 60, 1021–1027
- Layzer R, Lee HS, Iverson D, Margeta M (2009): Dermatomyositis with inclusion body myositis pathology. *Muscle Nerve* 40, 469–471

- Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B (1998): B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med* 187, 655–660
- Li E, You M, Hristova K (2005): Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Förster Resonance Energy Transfer Suggest Weak Interactions between Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) Transmembrane Domains in the Absence of Extracellular Domains and Ligands †. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 352–360
- Litinsky MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A (2002): DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* 3, 822–829
- Lotz BP, Engel AG, Nishino H, Stevens JC, Litchy WJ (1989): Inclusion body myositis observations in 40 patients. *Brain* 112, 727–747
- Luster AD (1998): Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338, 436–445
- Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA (1998): Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4-and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 95, 9448–9453
- Mackay F, Mackay CR (2002): The role of BAFF in B-cell maturation, T-cell activation and autoimmunity. *Trends Immunol* 23, 113–115
- Mackay F, Leung H (2006): The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol* 18, 284–289
- Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J (2003): BAFF and APRIL: A Tutorial on B Cell Survival. *Annu Rev Immunol* 21, 231–264
- Madry C (1998): The characterization of murine BCMA gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Int Immunol* 10, 1693–1702
- Martin F, Chan AC (2006): B CELL IMMUNOBIOLOGY IN DISEASE: Evolving Concepts from the Clinic. *Annu Rev Immunol* 24, 467–496
- 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

- Moisini I, Davidson A (2009): BAFF: a local and systemic target in autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 158, 155–163
- Moore PA (1999): BLyS: Member of the Tumor Necrosis Factor Family and B Lymphocyte Stimulator. *Science* 285, 260–263
- Morimoto S, Nakano S, Watanabe T, Tamayama Y, Mitsuo A, Nakiri Y, Suzuki J, Nozawa K, Amano H, Tokano Y, Kobata T, Takasaki Y (2007): Expression of B-cell activating factor of the tumour necrosis factor family (BAFF) in T cells in active systemic lupus erythematosus: the role of BAFF in T cell-dependent B cell pathogenic autoantibody production. *Rheumatol Oxf Engl* 46, 1083–1086
- Müntzing 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
- Muscle Study Group 2001 (2001): Randomized pilot trial of beta1NF1a (Avonex) in patients with inclusion body myositis. *Neurology* 57, 1566–1570
- Muscle Study Group 2004 (2004): Randomized pilot trial of high-dose beta1NF-1a in patients with inclusion body myositis. *Neurology* 63, 718–720
- Nagaraju K, Raben N, Merritt G, Loeffler L, Kirk K, Plotz P (1998): A variety of cytokines and immunological relevant surface molecules are expressed by normal human skeletal muscle cells under proinflammatory stimuli. *Clin Exp Immunol* 113, 407-414
- Nagaraju K (2001): Update on immunopathogenesis in inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 13, 461-468
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T (1996): Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635–638
- Noss EH, Hausner-Sypek DL, Weinblatt ME (2006): Rituximab as therapy for refractory polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol* 33, 1021–1026
- Novak AJ (2004): Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* 103, 689–694
- Ozawa E (2010): Our trails and trials in the subsarcolemmal cytoskeleton network and muscular dystrophy researches in the dystrophin era. *Proc Jpn Acad Ser B* 86, 798–821

- Peng A, Koffman BM, Malley JD, Dalakas MC (2000): Disease progression in sporadic inclusion body myositis: observations in 78 patients. *Neurology* 55, 296–298
- Pruijn GJM, Pluk H, van Hoeve BJA, van Dooren SHJ, Stammen-Vogelzangs J, van der Heijden A, Schelhaas HJ, Verbeek MM, Badrising UA, Arnardottir S et al. (2013): Autoantibodies to Cytosolic 5'-Nucleotidase 1A in inclusion body myositis. *Ann Neurol* 73, 397-407
- Ragheb S, Lisak R, Lewis R, Van Stavern G, Gonzales F, Simon K (2008): A potential role for B-cell activating factor in the pathogenesis of autoimmune myasthenia gravis. *Arch Neurol* 65, 1358
- Ramanan AV, Feldman BM (2002): Clinical features and outcomes of juvenile dermatomyositis and other childhood onset myositis syndromes. *Rheum Dis Clin North Am* 28, 833–857
- Roy R, Dansereau G, Tremblay JP, Belles-Isles M, Huard J, Labrecque C, Bouchard JP (1991): Expression of major histocompatibility complex antigens on human myoblasts. *Transplant Proc* 23, 799-801
- Salzer U, Jennings S, Grimbacher B (2007): To switch or not to switch—the opposing roles of TACI in terminal B cell differentiation. *Eur J Immunol* 37, 17–20
- Sayers ME, Chou SM, Calabrese LH (1992): Inclusion body myositis: analysis of 32 cases. *J Rheumatol* 19, 1385–1389
- Schmidt J (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, Bähr M, Dalakas MC (2008): Interrelation of inflammation and APP in sIBM: IL-1 beta induces accumulation of beta-amyloid in skeletal muscle. *Brain J Neurol* 131, 1228–1240
- Schneider P (2005): The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 17, 282–289
- Stohl W (2004): A therapeutic role for BLYS antagonists. *Lupus* 13, 317–322
- Stohl W, Metyas S, Tan SM, Cheema GS, Oamar B, Xu D, Roschke V, Wu Y, Baker KP, Hilbert DM (2003): B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: Longitudinal observations. *Arthritis Rheum* 48, 3475–3486

- Sutherland AP, Ng LG, Fletcher CA, Shum B, Newton RA, Grey ST, Rolph MS, Mackay F, Mackay CR (2005): BAFF augments certain Th1-associated inflammatory responses. *J Immunol* 174, 5537–5544
- Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S et al. (1998): The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591–594
- Tews DS, Goebel HH (1996): Cytokine expression profile in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 342–347
- Van der Meulen MFG, Bronner IM, Hoogendijk JE, Burger H, van Venrooij WJ, Voskuyl AE, Dinant HJ, Linssen WHJ.P, Wokke JHJ, de Visser M (2003): Polymyositis: an overdiagnosed entity. *Neurology* 61, 316–321
- Van der Pas J, Hengstman GJD, Ter Laak HJ, Borm GF, Van Engelen BGM (2004): Diagnostic value of MHC class I staining in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 136–139
- Walter MC, Lochmüller H, Toepfer M, Schlotter B, Reilich P, Schröder M, Müller-Felber W, Pongratz D (2000): High-dose immunoglobulin therapy in sporadic inclusion body myositis: a double-blind, placebo-controlled study. *J Neurol* 247, 22–28
- Yunis EJ, Samaha FJ (1971): Inclusion body myositis. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 25, 240–248
- Zlotnik A, Yoshie O (2000): Chemokines: A New Classification Review System and Their Role in Immunity. *Immunity* 12, 121–127
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR (1998): Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595–599
- Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AHM, Belfall B, Klamut HJ, Talbot J, Hodges RS, Ray PN, Worton RG (1988): The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 333, 466–469

Danksagung

Zum Gelingen meiner Arbeit bin ich vielen Menschen zu Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Jens Schmidt für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit. Seine ausgezeichnete Betreuung und fachliche Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen.

Ebenso danke ich Dipl.-Biol. Claudia Fokken für die Unterstützung bei dem Erlernen verschiedener Methoden und für ihre Bereitschaft, mit Rat zur Seite zu stehen.

Für die exzellente technische Unterstützung bedanke ich mich besonders bei Frau Fatima Betül Agdas.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. med. Arne Wrede (Neuropathologie der UMG), Herrn PD Dr. med. Lars Klinge (Neuropädiatrie der UMG) und Herrn Dr. med. Peter Balcarek (Unfallchirurgie der UMG) für die Bereitstellung von Probenmaterial. Dieser Dank gilt auch den neuropathologischen Abteilungen der Universitätskliniken Halle, Hannover und München.

Ich möchte mich bei der gesamten AG Schmidt bedanken, die mich sehr freundlich aufgenommen hat. Die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre, zahlreiche Tipps und Hilfestellungen haben die Fertigstellung meiner Arbeit sehr unterstützt.

All den fleißigen Korrekturlesern danke ich für die konstruktive Beurteilung meiner Arbeit.

Lebenslauf

Mein Name ist Luisa Margarita Hoffmann. Ich wurde am 31.05.1985 in Eutin in Schleswig-Holstein geboren.

Von 1996 bis 2005 besuchte ich das Freiherr-v.-Stein-Gymnasium in Oldenburg in Holstein und erreichte im Juni 2005 die Allgemeine Hochschulreife.

Anschließend besuchte ich für die Ausbildung zur Rettungssanitäterin von 2005 bis 2006 die Med-Ecole in Kiel und erlangte im März einen Abschluss als staatlich geprüfte Rettungssanitäterin.

Von 2006 bis 2012 studierte ich Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen und schloss das Studium im Mai 2012 erfolgreich mit dem Staatsexamen ab. Derzeit bin ich als Assistenzärztin in Weiterbildung zum Facharzt der Kinder- und Jugendmedizin am St. Vincenz-Krankenhaus in Paderborn angestellt.

Seit Juli 2009 bin ich Mitglied in der Arbeitsgruppe Muskelimmunbiologie von Herrn PD Dr. med. Jens Schmidt in der Abteilung Neurologie. Hierbei habe ich mein Hauptaugenmerk auf die Pathomechanismen der sporadischen Einschlusskörpermyositis gerichtet und die vorliegende wissenschaftliche Dissertation mit dem Titel „B-Zell-Pathomechanismen der akuten und chronischen Myositis: Ex-Vivo- und In-Vitro- Untersuchungen“ angefertigt.

Einen Teil meiner Ergebnisse konnte ich bereits in Form eines Posters auf dem 84. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) im September 2011 in Wiesbaden vorstellen und erlangte für meine Arbeit einen Posterpreis.