

Aus der Klinik für Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Mausmodell der Einschlusskörpermyositis:
Pathophysiologie des Muskels nach knock-down der induzierbaren
Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von
Thorben Ingo Alexy
aus Hannover

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. med. J. Schmidt
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Ekkehard Wilichowski
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 26.04.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1 Die Einschlusskörpermyositis	5
1.2 Pathomechanismen und Histologie.....	7
1.2.1 Entzündungskomponente.....	7
1.2.1 Degenerative Mechanismen.....	7
1.2.3 Oxidativer Stress bei der Einschlusskörpermyositis.....	8
1.3 Die Tiermodelle	9
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	10
2. Material und Methoden.....	11
2.1 RNA-Extraktion	11
2.2 cDNA-Synthese	11
2.3 Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	11
2.4 Histologie	12
2.4.1 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung	12
2.4.2 ThioflavinS.....	13
2.5 Immunhistochemie	13
2.5.1 Nitrotyrosin	14
2.5.2 iNOS.....	15
2.5.3 hAPP und mMHC I	15
2.5.4 T-Zell- und Makrophagen-Färbung.....	15
2.5.5 Fasertypen-Färbung.....	16
2.6 Western Blot.....	17
2.7 Verwendete Programme und Datenakquisition	17
3.1 Myopathische Veränderungen	19
3.1.1 iNOS-Defizienz reduziert myopathische Alterationen in der H&E-Färbung	20
3.1.2 Keine objektivierbaren Veränderungen in der Fasertypen-Konfiguration	23
3.2 Einfluss der iNOS-Defizienz auf die Inflammation.....	23
3.2.1 iNOS-/- Tiere zeigen eine erhöhte mRNA-Expression von IL-1 β und IL-6.....	24
3.2.2 Unveränderte mRNA-Expression von β 2-Mikroglobulin	25
3.2.3 iNOS-/- ohne signifikante Veränderung in der MHC I-Expression.....	26
3.2.4 Vermehrte T-Zellen und Makrophagen bei IBM-Tieren.....	27
3.3 Aggregationen.....	28
3.3.1 iNOS-/- Tiere zeigen eine erhöhte Expression von APP.....	29

3.3.2	<i>Keine wesentlichen Unterschiede in der APP-Färbung</i>	29
3.3.3	<i>IBM/iNOS-/- zeigen deutlich verminderte Aggregation von Amyloid mittels ThioflavinS-Färbung</i>	31
3.4	Oxidativer Stress	33
3.4.1	<i>iNOS auf mRNA-Expressionsebene nicht einheitlich nachweisbar</i>	33
3.4.2	<i>Schwaches Signal in der iNOS- und Nitrotyrosin-Färbung</i>	34
4.	Diskussion.....	36
5.	Zusammenfassung.....	41
6.	Literaturverzeichnis.....	42

1. Einleitung

1.1 Die Einschlusskörpermyositis

Die Einschlusskörpermyositis (engl. *inclusion body myositis*, IBM) ist eine langsam voranschreitende, entzündliche Muskelerkrankung und stellt die häufigste Variante einer Myopathie beim älteren Menschen dar (Kitazawa et al. 2009). Die Erstbeschreibung von Veränderungen, die der Einschlusskörpermyositis entsprachen, wurde bei einem Patienten im Jahre 1967 beschrieben, welcher an chronischer Polymyositis litt (Chou 1967). Die bis heute gängige Bezeichnung „Einschlusskörpermyositis“ wurde anschließend im Jahre 1971 geprägt (Yunis und Samaha 1971). Die Angaben zur Häufigkeit der Einschlusskörpermyositis sind in der Fachliteratur nicht einheitlich. Die Prävalenz bis zum 50. Lebensjahr wird mit 4,3 bis 9,3 pro 1.000.000 Menschen angegeben, jenseits dieses Lebensalters steigt sie bis hin zu 35,3/1.000.000 an (Dalakas 2006). Eine Zunahme der Prävalenz in den letzten Jahren wird auf eine vermehrt korrekte Diagnostizierung der IBM zurückgeführt (van der Meulen et al. 1998). Dabei findet sich eine geschlechterspezifische Verteilung der Erkrankungshäufigkeit von Männern zu Frauen von etwa 2:1 (Badrising et al. 2000).

Charakteristisch für die IBM ist eine schleichend beginnende, kontinuierlich progrediente Schwäche und Atrophie sowohl proximaler als auch distaler Muskelgruppen. Besondere Prominenz erlangt die Klinik der IBM dabei im *Musculus quadriceps femoris* und den tiefen Flexoren der Finger (Arnardottir et al. 2004). Ebenfalls regelmäßig präsentieren die Patienten Schwächen der Extensoren und Flexoren der Nackenmuskulatur sowie eine Dysphagie-Symptomatik, während sensorische Funktionen in der Regel unbeeinträchtigt bleiben (Dalakas 2006). In der Mehrzahl der Fälle führt die Einschlusskörpermyositis im Verlauf einiger Jahre zu einem klinisch stark beeinträchtigenden Kraftverlust sowie zur Notwendigkeit des Einsatzes von Hilfsmitteln zur Aufrechterhaltung der Mobilität (Dalakas 2006).

Trotz aller wissenschaftlichen Bemühungen verbleibt die Ätiologie der Erkrankung bis heute weitestgehend unbekannt (Arnardottir et al. 2004).

Die klinische Diagnose der IBM wird bestätigt durch die Bestimmung der Serum-Kreatinkinase (Serum-CK), die histologische Untersuchung von Muskelbiopsien sowie supportiv durch die Elektromyographie (EMG) (Dalakas 2006).

Zu den klinischen Diagnosekriterien gehört in erster Linie eine stärkere Schwäche der Knieextensoren als der Hüftflexoren, ebenso wie eine stärkere Beeinträchtigung der Fingerflexoren als der Schulterabduktoren. Zusätzlich werden zu den klinischen Kriterien eine Dauer der Symptomatik von mehr als 12 Monaten sowie ein Alter jenseits des 45. Lebensjahres gerechnet (Rose 2013).

Die Serum-Kreatinkinase kann sich sowohl im Rahmen der Referenzwerte befinden als auch milde erhöhte Werte aufweisen (Dalakas 2006). Eine Elevation um mehr als das 15-Fache des Normwertes spricht wiederum gegen eine IBM (Rose 2013).

Histologische Diagnose-Kriterien der IBM stellen entzündliche Infiltrate des Endomysiums, eine Hochregulation von MHC I in den Muskelfasern, sogenannte *rimmed vacuoles* und Protein-Akkumulationen von β -Amyloid und p62 oder 15-18 nm lange Filamente dar (Rose 2013).

Lichtmikroskopisch finden sich in den Muskelbiopsien betroffener Patienten die typischen Zeichen degenerativer Veränderungen. Hierzu gehören hypertrophische, atrophische und gespaltene Muskelfasern, vergesellschaftet mit einer Zunahme von Binde- und Fettgewebe sowie des Anteils internalisierter Nuclei an der Gesamtzahl der Zellkerne. Die Besonderheit der IBM liegt in dem parallelen Auftreten entzündlicher Komponenten wie der Invasion mononukleärer Entzündungszellen und der Infiltration von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten sowie den charakteristischen *rimmed vacuoles* (Arahata und Engel 1984). Aufgrund dieser entzündlichen Alterationen wird die IBM neben der Polymyositis, Dermatomyositis und der nekrotisierenden Autoimmun-Myositis den idiopathisch entzündlichen Myopathien zugeordnet (Rygiel et al. 2014).

Bis zum heutigen Tage ist keine effektive Therapiestrategie zur Reduzierung der klinischen Symptomatik oder zur Verlangsamung des Voranschreitens der Muskelschwäche bekannt, sodass die IBM meist innerhalb von 5-10 Jahren nach Auftreten der ersten Symptome zu der Notwendigkeit des Einsatzes von mobilitätserhaltenden Hilfsmitteln führt. Kurzfristige Erfolge sind in Einzelfällen durch die Gabe gängiger Autoimmuntherapeutika (Kortikosteroide, Azathioprin, Cyclosporin, Methotrexat, Immunglobuline, MMF, Cyclophosphamid etc.) erzielt worden (Carstens und Schmidt 2014). Für die Therapie mit Methotrexat konnte im Vergleich zur Gabe von Placebo ein positiver Effekt auf die bei der IBM erhöhte Serum-CK gezeigt werden, wobei die klinische Progression der Erkrankung jedoch unbeeinflusst blieb (Carstens und Schmidt 2014). Insbesondere die intravenöse Gabe von Immunglobulinen konnte bei einigen Patienten die klinische Symptomatik für eine gewisse Zeit lindern und zum Teil eine signifikante Verbesserung in Bezug auf die bereits erwähnte Dysphagie-Problematik erzielen. Jedoch konnte bei den meisten Patienten in der Vergangenheit weder durch immunsuppressive noch durch immunmodulatorische Therapie ein relevanter Benefit erzielt werden (Breithaupt und Schmidt 2014). Zusammenfassend betrachtet bleiben die bisherigen therapeutischen Ansätze somit deutlich hinter den Erwartungen zurück und müssen als frustriert bezeichnet werden (Dalakas 2006).

In dieser Dissertation soll die hereditäre Verlaufsform der IBM (hIBM) nicht eingehender betrachtet werden. Diese zeichnet sich durch einen Beginn bereits zwischen der zweiten und vierten Lebensdekade sowie durch eine familiäre Häufung des Auftretens aus (O’Ferrall und Sinnreich 2013).

Resümieren lässt sich, dass es sich bei der IBM um eine entzündliche, idiopathische Myopathie handelt, die bei vergleichsweise niedriger Inzidenz vor allem ältere Patienten ab der 5. Lebensdekade betrifft. Es sind Anzeichen degenerativer und inflammatorischer Aspekte gegeben, die Ähnlichkeiten mit der Polymyositis sowie der Alzheimer-Erkrankung aufweisen. Eine effektive Therapiestrategie existiert zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht und die Ätiologie verbleibt weitestgehend unbekannt. Die Erkrankung zeigt sich klinisch mit einem langsam progredienten Verlauf, der zunehmend die Bewegungsfähigkeit der Betroffenen einschränkt und eine letztlich deutlich verminderte Lebensqualität zur Folge hat.

1.2 Pathomechanismen und Histologie

Bei der IBM handelt es sich um eine Skelettmuskelerkrankung komplexer Genese und letztlich größtenteils unbekannter Ätiologie (Breithaupt und Schmidt 2014).

Angenommen wird ein Zusammenspiel von entzündlichen und degenerativen Prozessen, welches jedoch bislang weitgehend unverstanden verbleibt (Schmidt et al. 2012).

Beschrieben wurde zum Beispiel ein Zusammenhang der Expression des entzündungsunterhaltenden Zytokins IL-1 β und dem Auftreten von Amyloid-Plaques (Schmidt et al. 2008). Des Weiteren zeigt sich in den intakten Muskelfasern eine deutliche T-Zell-Invasion, während die vakuolarisierten Fasern eine Hochregulation des *major histocompatibility complex* I (MHC I) präsentieren. In zuletzt genannten finden sich zudem Akkumulationen sowohl fehlgefalteter MHC-Moleküle als auch von Amyloid (Dalakas 2006). Im Folgenden sollen diese Prozesse systematisch erläutert werden.

1.2.1 Entzündungskomponente

Während gesunde Muskelfasern weder MHC I noch MHC II exprimieren, findet sich bereits in frühen Krankheitsstadien der IBM eine Hochregulation von MHC I. Dies lässt sich sogar auf Muskelfasern nachweisen, die sich weit entfernt vom Ursprungsort der Entzündung befinden (Karpati et al. 1988).

Die vermehrte MHC I-Expression wird wesentlich durch proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ (INF- γ) und den Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) induziert.

Ein weiteres Charakteristikum der IBM ist die Invasion von CD8+ T-Lymphozyten, welche Aktivitätsmarker an ihrer Zelloberfläche präsentieren und mit hoher Wahrscheinlichkeit relevant für die Pathogenese der Erkrankung sind (Schmidt et al. 2004). Auch weitere Entzündungszellen wie Makrophagen und CD4+ T-Zellen sind in den entsprechenden Muskelfasern auffindbar, jedoch in deutlich geringerem Ausmaße als die CD8+ Lymphozyten (Arahata und Engel 1984).

Ebenfalls ein wichtiger Bestandteile der Entzündung im Rahmen der Einschlusskörpermyositis stellen Zytokine und Chemokine dar, wobei letztere den Anteil der Zytokin-Familie repräsentieren, der über Chemotaxis in der Lage ist, Entzündungszellen zum Wirkungsort zu leiten.

Wesentliche, bei der IBM beteiligte Chemokine sind CCL2, CCL3, CCL4 und CXCL9, während als relevante Zytokine beispielsweise IL-1 β , INF- γ , TNF- α und TGF- β zu nennen sind (Schmidt et al. 2012).

1.2.1 Degenerative Mechanismen

Das Vorhandensein degenerativer Prozesse in der Einschlusskörpermyositis wird zum einen bewiesen durch die Präsenz von Vakuolen in erkrankten Muskelfasern, welche meist frei von T-Zell-Invasion sind. Zum anderen lässt sich die Rolle der Degeneration durch intrazelluläre Ablagerungen

von kongorot positivem Amyloid und dem Vorläuferprotein von β -Amyloid (*amyloid precursor protein*, APP) sowie Presenilin-1, phosphoryliertes Tau-Protein, APO-E, α -Synuclein etc. zeigen (Askanas et al. 2012). Auffällig sind daher große histopathologische Ähnlichkeiten zwischen der IBM und der weitaus häufigeren Alzheimer-Erkrankung des zentralen Nervensystems (Kitazawa et al. 2006). Bezüglich der Amyloid-Aggregate stellt die IBM bislang, abgesehen von der degenerativen Makuladegeneration, die einzige Erkrankung dar, infolge derer es zu einer pathologisch vermehrten Ablagerung des β -Amyloid außerhalb des zentralen Nervensystems kommt (Kitazawa et al. 2009).

APP gehört zu den Membranglykoproteinen (Zheng und Koo 2006) und lässt sich sowohl in der äußeren Zellmembran als auch in der Membran von Zellorganellen wie den Endosomen, dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat finden. Die Funktion des APP ist noch Gegenstand aktueller Forschungen. Es bestehen Hinweise auf eine Funktion des APP in der Zelladhäsion sowie als Rezeptor an der Zelloberfläche analog zu Notch (Zheng und Koo 2006). Zusätzlich scheint APP eine Rolle in der Synaptogenese und dem Auswuchs neuronaler Ausläufer, beispielsweise nach traumatischer Nervenschädigung, zu besitzen (Priller et al. 2006). Hierbei werden sowohl parakrine als auch autokrine Prozesse sowie eine Co-Faktor-Funktion mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (engl. *epidermal growth factor*, EGF) diskutiert. Auch an dieser Stelle können Parallelen zu der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit gezogen werden. Da bei Patienten mit dieser Erkrankung reduzierte Mengen an APP nachgewiesen werden konnten, erscheint eine Beteiligung in der Pathogenese und Progression der Erkrankung wahrscheinlich (Zheng und Koo 2006).

In den Muskeln der Patienten mit IBM lässt sich eine lineare Korrelation der Erhöhung von *messenger* RNA (mRNA) für bestimmte Zytokine und Chemokine mit dem vermehrten Vorkommen von mRNA für APP finden (Schmidt et al. 2008). Im Gegensatz zur Alzheimer-Krankheit finden sich bei der IBM lediglich intrazelluläre β -Amyloid-Ablagerungen und keine Plaques im Extrazellularraum. In den Fasern der an der Einschlusskörpermyositis erkrankten Muskeln findet sich in erster Linie eine Akkumulation von A β -42 und verhältnismäßig selten von A β -40 (Askanas und Engel 1998). Bei der aus 42 Aminosäuren bestehenden Variante des A β handelt es sich um eine zytotoxischere Form, da sie vermehrt zur Bildung von Oligomeren und damit einhergehend zur Ausbildung polymerer β -Faltblatt-Struktur führt (Walsh et al. 2002).

1.2.3 Oxidativer Stress bei der Einschlusskörpermyositis

In den vakuolarisierten Muskelfasern der IBM werden Enzyme exprimiert, welche die zelluläre Abwehr gegen entstehenden oxidativen Stress fördern. Zu diesen lassen sich die induzierbare Stickoxidsynthetase (iNOS), die Superoxiddismutase 1 (SOD-1), die Glutathionperoxidase und verschiedene Katalasen zählen (Askanas und Engel 2001).

Von besonderer Bedeutung ist hierbei die iNOS, welche hohe Mengen von intrazellulärem Stickoxid (NO) zu generieren vermag, welches wiederum als potenter Redox-Faktor für freie Radikale dient (Colton et al. 2008). Es sind für NO sowohl fördernde Effekte auf den Zelluntergang als auch protektive Eigenschaften für das Langzeitüberleben von Zellen beschrieben (Guix et al. 2005). Diese ambivalente Wirkung von NO ist beispielsweise für traumatische Hirnschädigungen (Bayir et al. 2005)

und für die Alzheimer-Krankheit (Colton et al. 2008) aufgezeigt worden. Für die IBM ist eine Assoziation einer erhöhten NO-Menge mit intrazellulären Protein-Akkumulationen, vor allem bezüglich β -Amyloid, ebenfalls nachgewiesen worden (Yang et al. 1998). Eine Hochregulation von iNOS konnte experimentell in Muskelzellen durch Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und INF- γ erreicht werden. Dies wiederum führte zu vermehrten Protein-Akkumulationen mit der Konsequenz des verfrühten Zelltodes durch Apoptose. Dementsprechend konnten solche Effekte durch die Verabreichung von pharmakologischen Inhibitoren der iNOS (beispielsweise des Pharmakons *W1400*) verhindert werden (Schmidt et al. 2012).

Die weitere Untersuchung dieser eventuell protektiven Wirkung einer Suppression der iNOS stellte einen wesentlichen Gegenstand dieser Arbeit dar. Diese Suppression wurde in den Tieren durch einen genetischen *knock-out* der iNOS erreicht.

1.3 Die Tiermodelle

Das Tiermodell der IBM-Maus, wie es auch für die vorliegende Arbeit verwendet wurde, ist ein 2006 entwickeltes Modell (Kitazawa et al. 2006). Es handelt sich dabei um doppelt-transgene Mäuse für das humane Amyloid Precursor Protein (hAPP) in der sogenannten „schwedischen Mutation“ in Kombination mit einer Mutation (PS1_{M146V}) für das Transmembranprotein Präsenilin (Kitazawa et al. 2006). Die Transkription beider Gene geschieht über den Promotor der muskelspezifischen Kreatinkinase der Tiere. Somit ist eine Spezifität für Muskelzellen für beide Proteine gegeben.

Durch dieses doppelt-transgene Tiermodell entsteht ein histopathologisches Erscheinungsbild, welches einige Mechanismen der Einschlusskörpermyositis beinhaltet. So kommt es zu den typischen Amyloid-Ablagerungen in den Muskelfasern, zur vermehrten Zentralisierung von Nuclei, einer leichten Verminderung des mittleren Faserquerschnitts und zu der sich daraus ergebenden erhöhten Variation des Faserdurchmessers. Ebenso zeigt sich eine verstärkte Einwanderung von Entzündungszellen sowie eine Elevation der Aktivität der Glykogensynthase-Kinase 3- β (Kitazawa et al. 2009).

Entzündliche Mechanismen einschließlich einer Hochregulation von MHC-I und T-Zell-Infiltrationen wurden ebenfalls in vorangegangenen Arbeiten beschrieben (Kitazawa et al. 2006).

Auch wenn das hier beschriebene Modell nicht alle Mechanismen und das nicht das vollständige klinische Bild der IBM umfasst, stellt es derzeit dennoch das beste Modell der Einschlusskörpermyositis dar.

Bei den Bl6-Tieren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, handelt es sich um die Kontrollgruppe. Sie stellen in ihrer genotypischen Beschaffenheit die Basis dar, wie sie auch den anderen Gruppen zugrunde liegt.

Bei den iNOS^{-/-} Mäusen handelt es sich um eine Gruppe, welche durch Mutation einen genetischen *knock-out* der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase erfahren hat. Durch Vergleiche dieser Tiere mit den anderen Gruppen differenter genetischer Konditionen sollte ein besseres Verständnis der Auswirkungen einer iNOS-Defizienz auf die Progression der Einschlusskörpermyositis erlangt werden.

Bereits in wegweisenden vorangegangenen Arbeiten ist dieses Modell, NOS2^{-/-}B6.129P2-NOS2^{tm1Lau}, verwendet worden (Jackson Lab Stock Number: 002609).

Durch eine Vernetzung der iNOS-defizienten Mäusen mit APP/PS1-transgenen Tieren ist somit eine IBM-Maus mit iNOS-Defizienz entstanden. Diese diente vorrangig dem Ziel, den Einfluss einer iNOS-Defizienz bezüglich Veränderungen in der Proteinexpression auf mRNA-Ebene sowie in der Histopathologie im Verlaufe der Einschlusskörpermyositis aufzuzeigen.

Besonderes Augenmerk lag in dieser Arbeit auf dem Vergleich der IBM-Mäuse mit den IBM/iNOS^{-/-}-Mäusen. Auftretende Unterschiede bezüglich der Proteinexpression auf mRNA-Ebene und der Histopathologie zwischen den beiden genannten Gruppen lassen eine Kausalität aufgrund der iNOS-Defizienz der IBM/iNOS^{-/-}-Tiere annehmen.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit sollte es zum einen sein, die Anwendbarkeit des vorliegenden IBM-Mausmodells respektive der Pathomechanismen der Einschlusskörpermyositis zu belegen. Hierbei lag der Fokus auf der Quantifizierung der mRNA-Expression sowie verschiedener histopathologischer Methoden.

Zum anderen diente diese Arbeit der Klärung der Frage, inwieweit eine Defizienz der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase einen Einfluss auf die Progression und die histopathologischen Charakteristika der IBM besitzt. Besonderer Fokus lag hierbei auf dem Vergleich der Untersuchungsergebnisse der IBM-Tiere mit der IBM/iNOS^{-/-}-Gruppe.

2. Material und Methoden

2.1 RNA-Extraktion

Gemäß Herstellerangaben wurde die RNA-Extraktion mittels des Qiagen-Rneasy-Kits (Qiagen Hamburg GmbH, Hamburg) durchgeführt. Zur Vorbereitung der Extraktion wurden die Gewebeproben zunächst in eine Suspension überführt, um sie der weiteren Bearbeitung zugänglich zu machen. Hierfür wurden die Proben in speziellen Säulen platziert und anschließend kleine Kügelchen, bestehend aus Keramik, sowie 900 µl Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) hinzugegeben. Die gewünschte Suspension wurde durch ein trizyklisches Verfahren mittels einer Homogenisations-Zentrifuge (precellys 24, peqlab, Erlangen) erreicht. Zur Konzentrationsbestimmung der entstandenen RNA wurde ein photometrisches Verfahren unter Verwendung des Nanodrop Spektralphotometers (NanoDrop 2000, NanoDrop Products, Wilmington, USA) durchgeführt. Dies ermöglichte eine Quantifizierung der Nukleinsäuren unter Verwendung von lediglich 1 µl der jeweiligen Probe. Die Messung der RNA-Konzentration fand durch Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm statt. Nach erfolgreichem Abschluss der Extraktion und Konzentrationsbestimmung wurden die Proben bei -80 °C tiefgefroren gelagert oder der unmittelbaren weiteren Verarbeitung zugeführt.

2.2 cDNA-Synthese

Die komplementäre DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) zu der zuvor hergestellten mRNA wurde entsprechend den Herstellerangaben unter Zuhilfenahme des SuperScript TMII Kits (Life Technologies GmbH, Darmstadt, (Hessen)) synthetisiert. Als Startpunkt der RNA-abhängigen DNA-Polymerase diente hierbei ein zum Poly-A-Schwanz der mRNA komplementäres Oligo-dT-Nukleotid. Eine reverse Transkriptase sowie eine Mischung verschiedener Desoxyribonucleotidtriphosphate (nNTP) ergänzte im Anschluss den entsprechenden cDNA-Strang. Die letztlich entstandene doppelsträngige DNA wurde bei -20 °C gelagert oder gegebenenfalls einer unmittelbaren weiteren Verarbeitung zugeführt.

2.3 Quantitative *real-time* PCR

Die quantitative rtPCR basiert auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) in Echtzeit (*real time*). Das Ziel dieses Verfahrens ist eine Amplifikation der cDNA sowie Quantifizierung der gewonnenen, vervielfältigten Nukleinsäuren via Fluoreszenzmessung. Somit ist eine quantitative Analyse der Expression spezifischer Gene möglich. Die mRNA-Expression der einzelnen Targets wurde ins Verhältnis zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

(GAPDH) gesetzt. Bei der GAPDH handelt es sich um ein ubiquitäres und in allen verwendeten Proben in ähnlichem Maße vorkommendes Enzym der intrazellulären Glykolyse, welche dementsprechend als sogenanntes *housekeeping-gene* bezeichnet wird. Eine Bestimmung der relativen mRNA-Expression der Targets wurde somit möglich.

Die Berechnung erfolgte letztlich nach der $2^{-\Delta Ct}$ -Methode.

Sowohl die benötigten Oligonucleotid-Primer als auch der PCR Master Mix stammten von der Firma Solaris, während die Polymerasekettenreaktion mittels des ABI-7900 (Applied Biosystems, Darmstadt (Hessen)) durchgeführt wurde. Auf jeden Probenansatz von insgesamt 20 μl entfiel 1 μl auf die entsprechende cDNA.

Die Temperatur-Zeit-Sequenz begann mit einer 2-minütigen Dekontamination bei 50 °C und einer folgenden Denaturierung über 10 Minuten bei 95 °C. Anschließend erfolgte die Amplifikation in 40 Zyklen à 15 Sekunden bei weiterhin 95 °C sowie über 60 Sekunden bei nunmehr nur noch 60 °C.

2.4 Histologie

Die bereits präparierten Proben waren auf Korkplatten (Slee Mainz, Rheinland-Pfalz) aufgetragen, mit Tissue Tek (Sakura, Niederlande) beschichtet und in n-Methylbutan (Roth, Karlsruhe (Baden-Württemberg)) eingebettet und bei -80 °C eingefroren gelagert.

Diese Proben wurden mittels eines Cryotoms (Leica CM3050, Leica Mikrosysteme, Wetzlar (Hessen)) in 10 μm dicke Querschnitte überführt. Zur weitergehenden Mikroskopie sowie für die verschiedenen Färbungen wurden die Schnitte auf Objektträgern (LabSolute, Th. Geyer Gruppe, Renningen (Baden-Württemberg)) mit adhäsiven Eigenschaften aufgebracht.

2.4.1 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Zur Hämatoxylin- und Eosin-Färbung wurden zunächst die 10 μm dicken, bei -80 °C gelagerten Schnitte 10 Minuten lang bei Raumtemperatur aufgetaut.

Anschließend erfolgte eine Fixierung über 10 Minuten mittels 4-prozentigem Paraformaldehyds (4% PFA), welches mit 1x *phosphate buffered saline* (PBS) aus 32-prozentigem PFA frisch hergestellt wurde. Nun wurden die Schnitte mit 1xPBS dreimalig für je 4 Minuten gewaschen und anschließend für 2 Minuten mit dH_2O gespült. Danach erfolgte die Färbung mit Hämalaun nach Meyer für Kryoschnitte über 10 Minuten, gefolgt von einem 10-minütigen Waschvorgang unter fließendem Leitungswasser bis zur vollständigen Entfernung des Hämalauns aus dem Probengefäß. Nach erneuter Hinzugabe von dH_2O über 2 Minuten erfolgte dann die Färbung mit Eosin über 30 Sekunden mit anschließend in gleicher Weise durchgeführter Waschung mit dH_2O .

Abschließend wurde die Proben einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 99% Ethanol) zugeführt. Hierbei wurde jeder Schritt zweimal und für je 5 Minuten ausgeführt. Diese Reihe endete mit der zweimaligen Zugabe von Xylol über 10 Minuten.

Nach erfolgter Eindeckelung mittels Entellan (Merck KGaA, Darmstadt (Hessen)) wurden die Proben - nach halbstündiger Trocknung - lichtgeschützt und bei Raumtemperatur zur weiteren Aufarbeitung verwahrt.

Die Bestimmung und Auswertung der CNI und des mittleren Faserdurchmessers wurde mittels der *analySIS^{AB}_1045* Software manuell an einem Mikroskop (Olympus, Hamburg) vorgenommen.

Es wurden nur Muskelfasern in die Analyse miteinbezogen, welche in ihrer Gesamtheit auf dem jeweiligen histologischen Schnitt sichtbar sowie frei von Überlagerungen durch Artefakte jedweder Genese waren. Dies garantierte eine Vermeidung von Fehlmessungen des Faserdurchmessers sowie falsch niedrig ermittelte Zählungen peripherer Zellkerne.

2.4.2 ThioflavinS

Die ThioflavinS-Färbung ermöglichte den Nachweis der krankheitstypischen Akkumulationen von Amyloid-Aggregaten. Hierbei wurden β -Faltblatt-Strukturen fluoreszierend und spezifisch angefärbt, wie sie in den entsprechenden Aggregationen gehäuft auftreten.

Zur Färbung wurden die Objektträger mit PFA für 10 Minuten fixiert, anschließend dreimalig für jeweils 2 Minuten mittels dH_2O gewaschen und letztlich für 5 Minuten durch 1-prozentiges ThioflavinS (Sigma Life Science, USA) angefärbt. Nach erfolgter Inkubation wurden alle weiteren Schritte unter möglichst vollständigem Lichtausschluss vorgenommen.

Es erfolgte nun eine Zugabe von 70-prozentigem Ethanol über 5 Minuten und eine erneute Waschung mit dH_2O auf bereits beschriebene Art und Weise. Die Anfärbung der Zellkerne wurde durch eine 30 Sekunden andauernde Inkubation mit DAPI erzielt, bevor nach dreimaliger Waschung mit PBS über 3 Minuten die Eindeckelung mittels Fluoromount-G (Southern Biotech, USA) erfolgte. Die weitere Lagerung bei Raumtemperatur erfolgte unter abgedunkelten Bedingungen und die anschließende mikroskopische Analyse geschah binnen 36 Stunden.

2.5 Immunhistochemie

Nach einer Auftauzeit von 10 Minuten wurden die Gewebeschnitte zunächst mit 1x PBS über 5 Minuten gewaschen. Nach der jeweiligen Fixierung durch entweder 4-prozentiges Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur oder durch Aceton bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Proben auf den Objektträgern mithilfe des *Super PAP Pen Liquid Blocker* (Science Services, Colorado, USA) umkreist, um im weiteren Verlauf hinzugefügte Substanzen im Bereich der Schnitte zu halten. Anschließend erfolgte

eine Blockierung der Proben mittels eines 1:1-Gemisches aus 10-prozentigem *bovine serum albumin* (BSA) und 100-prozentigem Ziegenserum (Merck, Darmstadt (Hessen)) über 30 Minuten. Nach diesem Schritt erfolgte erneut die einmalige Waschung mit 1xPBS über 5 Minuten.

Von diesem Augenblick an wurden alle weiteren Arbeitsschritte bis zur Eindeckelung der Objektträger unter möglichst vollständigem Lichtausschluss sowie unter Verwendung einer „feuchten Kammer“ durchgeführt. Bei dieser „feuchten Kammer“ handelte es sich um eine dafür vorgesehene Box adäquater Größe, in welcher durch Einlage mehrerer wassergetränkter Zellstoff-Tücher eine entsprechende Innenfeuchtigkeit erreicht wurde.

Nun erfolgte die Inkubation mit dem jeweils benötigten Primärantikörper in einer Verdünnung mit 1-prozentigem BSA über eine Stunde. Nach deren Ablauf wurden die Objektträger dreimalig für 2 Minuten mit 1xPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die 45-minütige Inkubation mit den entsprechenden fluoreszierenden Sekundärantikörpern, bevor erneut mit 1xPBS in 3 Durchgängen je 2 Minuten lang gewaschen wurde. Nach Abschluss dieses Waschvorganges folgte nunmehr die Inkubation mit entweder einem weiteren Primärantikörper (im Falle einer Doppelfärbung) oder die unmittelbare Inkubation in 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) über 1 Minute mit anschließender Waschung mittels 1xPBS in bereits beschriebener Manier. Bei der DAPI-Färbung handelt es sich um eine spezifische Anfärbung der Zellkerne. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Proben mithilfe von Fluoromount-G eingedeckelt und unter erneutem Lichtausschluss bis zur weiteren mikroskopischen Betrachtung bei Raumtemperatur gelagert.

Dieser Abschnitt beschreibt den allgemeinen Ablauf der folgenden Einzelfärbungen. Die Spezifika der jeweiligen Anwendungen werden in den Abschnitten 2.5.1 bis 2.5.3 erläutert.

2.5.1 Nitrotyrosin

Die Fixierung der Schnitte erfolgte im Falle der Nitrotyrosin-Färbung mittels 4-prozentigem PFA. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS für je 5 Minuten wurden die Proben für 10 Minuten mit MeOH (Roth, Karlsruhe (Baden-Württemberg)) bei -20 °C inkubiert. Anschließend erfolgten Blockierung und erneutes Waschen mittels 1xPBS wie oben beschrieben.

Die Inkubation der Proben über 1 Stunde wurde mit dem Erstantikörper Anti-Nitrotyrosin (Upstate 06-284) in einer Verdünnung von 1:200 mit 1-prozentigem BSA durchgeführt.

Anschließend wurde erneut mit 1xPBS dreimal in o.g. Weise gewaschen und unmittelbar danach der Zweitantikörper *goat anti-rabbit* Alexa 594 (rot) in einer Verdünnung von 1:66 mit 1-prozentigem BSA über 45 Minuten hinzugegeben.

2.5.2 iNOS

Die Fixierung erfolgte mittels 4-prozentigem PFA über 10 Minuten, anschließend wurden die Proben dreimalig in beschriebener Weise mit 1xPBS gewaschen und eine Inkubation mit MeOH für 10 Minuten bei -20 °C eingeleitet. Anschließend erfolgten Blockierung und erneutes Waschen mittels 1xPBS wie oben beschrieben.

Der Erstantikörper anti-iNOS (Millipore AB5384) wurde in einer Verdünnung von 1:500 mit 1-prozentigem BSA für 1 Stunde hinzugegeben.

Es erfolgte erneut eine dreimalige Waschung der Gewebeproben mit 1xPBS für je 5 Minuten und dann die Zugabe des Zweitantikörpers goat anti rabbit Alexa 594 (rot), verdünnt 1:600 mit 1-prozentigem BSA über 45 Minuten.

2.5.3 hAPP und mMHC I

Die Fixierung erfolgte bei dieser Färbung bei -20 °C mittels Aceton und anschließend wurden die Proben einige Minuten abdampfen gelassen. Anschließend erfolgten Blockierung und erneutes Waschen mittels 1xPBS wie oben beschrieben. Nun wurde der rabbit anti-APP Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 mit 1xBSA sowie der *rat anti-mouse* MHC I-Antikörper, verdünnt um 1:100 mit 1xBSA hinzugegeben.

Nach Inkubation über 1 Stunde und dreimaligem Waschen in oben genannter Weise mit 1xPBS erfolgte die Zugabe des Alexa 594 *anti rabbit* Antikörpers (rot) und des *goat anti rat* Antikörper Alexa 488 (grün) in einer jeweiliger Verdünnung von 1:600 mit 1xBSA.

Die Auswertung der Färbungen wurde mittels eines selbstentwickelten Scores vorgenommen. Dieser ordnete unter Betrachtung mehrerer hundert Zellen pro Probe jeder Zelle einen Zahlenwert zwischen 0 und 3 zu. Ein Wert von „0“ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die entsprechende Zelle kein visuell zu detektierendes Signal präsentierte. „1“ beschrieb Zellen, welche sich für MHC I und „2“ positiv zeigten und „2“ jene Zellen, welche Signal für hAPP enthielten. Konnten Signalanteile beider Marker erkannt werden, so wurde der entsprechenden Zelle die Ziffer „3“ zuteil.

2.5.4 T-Zell- und Makrophagen-Färbung

Zunächst wurden die Gefrierschnitte 10 Minuten lang unter Raumluft aufgetaut, um dann für weitere 10 Minuten mittels Aceton bei -20 °C fixiert zu werden und anschließend einige Minuten zu trocknen.

Nach Umrandung der Gewebe mit Hilfe eines *Super PAP Pen Liquid Blocker* erfolgte die Blockierung der Proben durch ein 1:1-Gemisch aus 10-prozentigem BSA und *rabbit serum* über 30 Minuten und

eine daran angeschlossene Waschung mit 1xPBS über 5 Minuten. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter Ausschluss von Licht und in einer sog. „feuchten Kammer“ durchgeführt.

Nun erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper *rat anti mouse* MAC3 für Makrophagen in einer Verdünnung von 1:200 mit 1xBSA sowie für den jeweils anderen Gefrierschnitt mit *rat anti-mouse* CD3 für T-Zellen, verdünnt um 1:100 mit 1xBSA. Die Zeit der Inkubation betrug mindestens 1 Stunde oder wurde wahlweise über Nacht bei -4 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Proben dreimalig für je 5 Minuten mit 1xPBS gewaschen und dann über 30 Minuten einem Peroxidase-Block zugeführt. Nach dessen Vollendung erfolgte erneut in bereits beschriebener Weise die Waschung mit PBS in vierfacher Wiederholung.

Die Zugabe des Zweitantikörpers geschah in 1:100-Verdünnung mit 1-prozentigem BSA über 1 Stunde. Benutzt wurde an dieser Stelle der Antikörper *anti-rat* IgG Biotin. Darauf folgten erneut dreimalige Waschungen mit 1xPBS und anschließend eine Inkubation mit einem Peroxidase-Komplex (Sigma Avidin Peroxidase 1:1000 mit 1xPBS) für 1 Stunde. Nun wurden die Proben dreimalig mit 1xPBS über 5 Minuten gewaschen und für 12 Minuten wurde DAB hinzugegeben, dessen Inkubation nach Ablauf der entsprechenden Wirkzeit mit dH₂O in 3 Zyklen zu je 2 Minuten gestoppt wurde.

Eine Gegenfärbung erfolgte mittels Hämalaun für 2 Minuten, bevor erneut viermalig dH₂O über 2 Minuten zum Einsatz kam. Die Gefrierschnitte konnten nun einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt werden, wobei jede Konzentration über einen Zeitraum von 2 Minuten appliziert wurde (50%, 60%, 75%, 90%, 96%, 100%).

Abschließend wurden die Proben für 2 Minuten mit 100-prozentigem Xylen I und II versetzt und zuletzt mit Entellan eingedeckelt. Die Verwahrung fand unter bestehendem Lichtausschluss und bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung statt.

2.5.5 Fasertypen-Färbung

Die Gefrierschnitte wurden zunächst unter Raumluft aufgetaut und mittels Aceton bei -20 °C fixiert, um dann der Blockierung für 60 Minuten mit einem 1:1-Gemisch aus 10-prozentigem BSA und goat serum zugeführt zu werden. Nun erfolgte eine dreimalige Waschung mit 1xPBS für je 5 Minuten und für alle weiteren Arbeitsschritte wurde unter Lichtausschluss in einer „feuchten Kammer“ gearbeitet.

Nun erfolgte die Applikation des ersten Antikörper-Cocktails, bestehend aus BA-F8 (I, Maus IgG2b), SC-71 (IIa, Maus IgG1), BF-F3 (IIb, Maus IgM) und 6H1 (IIx, Maus IgM). Alle Antikörper wurden mit 1-prozentigem BSA in individuellem Verhältnis verdünnt. Für BA-F8 und 6H1 war das Verhältnis 1:50, für SC-71 1:600 und für BF-F3 entsprach die Verdünnung 1:100. Die Inkubationszeit belief sich für alle Antikörper auf 60 Minuten oder wahlweise über Nacht.

Als Zwischenschritt erfolgte erneut dreimaliges Waschen der Proben in oben beschriebener Weise mit 1xPBS und anschließend konnten die Zweitantikörper hinzugegeben werden.

Hier wurden in einer Verdünnung von 1:500 mit 1-prozentigem BSA die Sekundärantikörper Alexa Fluor *goat anti-mouse* IgG 26 350, IgG 1 488 und IgM 594 verwendet.

Nach erfolgter Inkubation der Zweitantikörper über 1 Stunde, wurden die Proben erneut dreimalig mit 1xPBS für jeweils 5 Minuten gewaschen und mit Fluoromount G eingedeckelt. Die Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung.

2.6 Western Blot

Im Rahmen dieser Arbeit sind durch die medizintechnischen Assistentinnen des Weiteren probatorisch mehrfach Western Blots nach etabliertem Standardprotokoll der Arbeitsgruppe durchgeführt worden. Die Zielsetzung in diesem Falle war der Nachweis von Nitrotyrosin an verschiedenen Gewebeproben der Versuchstiere. Da sich ein Zugewinn an Information und Erkenntnis hierdurch jedoch nicht erreichen ließ, wurde die Fortführung dieser Methodik eingestellt, sodass an dieser Stelle auf eine detaillierte Beschreibung des verwendeten Protokolls verzichtet wurde.

2.7 Verwendete Programme und Datenakquisition

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Programme zur Darstellung der Daten sowie zur Auswertung der Ergebnisse verwendet.

Für den Schreibprozess der Dissertation wurde überwiegend *Microsoft Office Word 2010*, für die Erstellung verschiedener Tabellen *Microsoft Office Excel 2010* verwendet.

Zur Analyse des CNI (in %) und des Muskelfaserdurchmessers kam das Programm *analySIS^B_1045*, zur Betrachtung der immunhistochemischen Färbungen *Image-Pro* für Windows 2000/XP von Media Cybernetics (Washington, USA) zum Einsatz. Die Betrachtung und Analyse der pPCR-Daten geschah über die spezifisch für diese Anforderungen entwickelte *7500 Software v2.0.6* der Herstellerfirma Applied Biosystems (Massachusetts, USA).

Unter anderem zur Auswertung der ThioflavinS- und Nitrotyrosin-Färbungen wurde *Image J 1.48* von Wayne Rasband (National Institutes of Health, USA) benutzt. Hierbei wurde ein durch unsere Arbeitsgruppe eigens für diese Arbeit programmiertes Skript verwendet, welches spezifisch auf die Erfordernisse im Rahmen dieser Färbungen zugeschnitten war. Das besagte Skript konnte für die Anforderungen der einzelnen Färbungen exakt angepasst und modifiziert werden.

Zur graphischen Darstellung sowie zur Vorbereitung verschiedener Präsentationen wurde auf *Microsoft Office PowerPoint 2010* und *GraphPad Prism 6.0*, entwickelt durch Graphpad Software Inc. (Kalifornien, USA), zurückgegriffen.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für MHC I, APP sowie für iNOS bedurften der Entwicklung eines visuell ermittelbaren Scores. Anhand dieses unkomplizierten Analyseverfahrens konnte unterschieden werden, ob und gegebenenfalls mit welcher Intensität Zellen angefärbt waren, oder ob der Zustand der Anfärbung nicht zu eruieren war.

Bei den statistischen Auswertungen wurde das bereits erwähnte Programm GraphPad Prism 6.0 verwendet. Für alle Experimente wurden über die Funktion *column analysis* identische Berechnungen durchgeführt. Ermittelte Parameter waren dabei in erster Linie die Minima und Maxima, Mittelwert, Varianz, Standardfehler sowie der mittlere Standardfehler. Zur Varianzanalyse diente die einfaktorielle (*one-way*) ANOVA. Zusätzlich wurden alle Ergebnisse untereinander verglichen und in Bezug zu denen der Kontrollgruppe gesetzt. Das Konfidenzintervall wurde bei 0,95 und das Signifikanzlevel bei 0,05 festgelegt. Zudem wurde als *post test* für einen balanzierten Fall der Tukey-Test gewählt.

3. Ergebnisse

Herauszufinden, inwieweit ein *knock-out* der iNOS einen Einfluss auf die Progression myopathischer Erkrankungen wie der Einschlusskörpermyositis besitzt, war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit.

Um die Übersichtlichkeit über die verschiedenen Versuche zu gewährleisten, wurde der Ergebnisteil in vier Kategorien eingeteilt, welche jeweils mehrere Methoden umfassen.

So fallen unter den Teil der „Myopathischen Veränderungen“ alle Auswertungen, die mit Hilfe von Färbungen mit Hämatoxylin und Eosin sowie der Fasertypen ermittelt wurden.

Die Kategorie „Einfluss der iNOS-Defizienz auf die Inflammation“ beinhaltet Entzündungsnachweise auf Ebene der mRNA-Expression via qPCR anhand verschiedener Marker wie IL-1 β , IL-6 und β 2M sowie immunhistochemische Färbungen mit MHC I.

Darauf folgen die Analysen zur „Aggregation“, welche die qPCR-Daten des Markers APP sowie immunhistochemische Färbungen mit hAPP und ThioflavinS umfassen.

Der Abschluss des Ergebnisteils wird durch qPCR-Analyse mit dem Marker iNOS und Färbungen auf Nitrotyrosin und iNOS gebildet. Dies ist zusammengefasst zu der Kategorie „Oxidativer Stress“.

3.1 Myopathische Veränderungen

Es sind verschiedene histologisch sichtbare Veränderungen bekannt, welche im Kontext mit Myopathien verschiedener Genese typischerweise auftreten können. Zu diesen Alterationen gehören ein prozentuell erhöhter Anteil zentralisierter Zellkerne, eine Zunahme der Variationsbreite des Muskelfaserdurchmessers sowie eine Steigerung des Anteils an Fett- und Bindegewebe in den jeweiligen Muskelproben.

Als Maßeinheit des steigenden Anteils zentralisierter Zellkerne diene ein Index-Wert (CNI in %), angegeben in Prozent. Bei dem CNI (engl. *central nuclear index*) handelt es sich um den Anteil der zentralisierten Kerne in den Muskelfasern in Relation zur Gesamtzahl der Zellkerne. Die Angabe erfolgt in Prozentpunkten.

Der Analyse solcher myopathischen Veränderungen diene in erster Linie die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin an 10 μ m dicken Gewebeschnitten, welche auf gleiche Weise und unter identischen Bedingungen hergestellt, gelagert und verarbeitet worden sind. Betrachtete Parameter stellten sowohl die CNI in Prozent als auch die Variation des mittleren Faserquerschnitts und der mittlere Faserdurchmesser dar.

Des Weiteren wurden Fasertypen-Färbungen durchgeführt, um prozentuelle Veränderungen des Verhältnisses verschiedener Muskelfasertypen (I, IIa, IIb, IIx,) zueinander detektieren zu können.

3.1.1 *iNOS-Defizienz reduziert myopathische Alterationen in der H&E-Färbung*

Zur Auswertung der Hämatoxylin- und Eosin-Färbung wurden 300-500 Fasern des jeweiligen Muskels ausgezählt. Sie wurden anhand der im Material- und Methoden-Teil genannten Kriterien einzeln ausgewählt.

Anschließend wurde der kleinstmögliche Durchmesser der Muskelfasern, die Gesamtzahl der Zellkerne im betrachteten Muskelabschnitt sowie die Anzahl lediglich der zentralisierten Nuclei ermittelt. Aufgrund dieser Parameter ließ sich untersuchen, inwiefern myopathische Veränderungen stattgefunden haben. Eine Erhöhung der Variationsbreite des durchschnittlichen Faserdurchmessers, sei es der kleinstmögliche oder größtmögliche, sowie eine Zunahme internalisierter Zellkerne spräche in diesem Kontext für das Vorhandensein verstärkter myopathischer Vorgänge.

Das wesentliche Ergebnis der Analyse der Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen unter Betrachtung des Parameters CNI war, dass sich ein altersabhängiger Anstieg an myopathischen Veränderungen nachweisen ließ. Dies zeigte sich für alle untersuchten genetisch differenten Gruppen.

Im Falle der Bl6 steigerte sich der prozentuale Anteil an zentralisierten Zellkernen zu allen Nuclei von 0,20% (6 Monate alte Tiere) auf 0,94% (24 Monate alte Tiere). Vergleichbar deutlich zeigte sich bei den IBM-Tieren ein Anstieg des CNI von 1,00% (6 Monate alte Tiere) auf 2,56% (24 Monate alte Tiere). Auch die IBM/*iNOS*^{-/-} Gruppe zeigte einen gesteigerten CNI von 0,19% (6 Monate alte Tiere) auf 1,16% (24 Monate alte Tiere). Hingegen relativ konstant zeigten sich die myopathischen Veränderungen in den *iNOS*^{-/-} Mäusen bei einem CNI in allen Altersgruppen von etwa 1,00%.

Ein weiteres Resultat der Auszählung des prozentualen Anteils an zentralisierten Zellkernen war, dass die Gruppe der IBM-Tiere deutlich stärkere myopathische Veränderungen als alle anderen Gruppen aufwies.

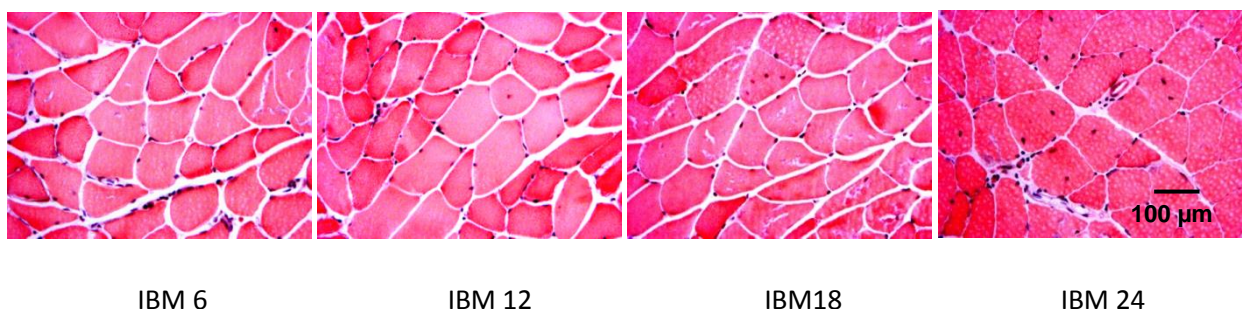


Abbildung 1: Histologische Querschnitte der IBM-Tiere mit **Hämatoxylin und Eosin** angefärbt (Vergrößerung 40x). Altersstufen von 6, 12, 18 und 24 Monaten. Balken: 100 μm.

Zusätzlich ist in den Abbildungen 3 und 4 graphisch gezeigt, wie sich der CNI (%) mit zunehmendem Alter der Muskeln verändert und die IBM-Tiere den deutlichsten Anstieg verzeichnen.

Während sich bei den 6 Monate alten Tieren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten, konnte bereits bei den 12 Monate alten Gruppen eine Erhöhung des Mittelwerts der CNI auf 0,91% von allen Nuclei bei den IBM gesehen werden. Dementgegen lag die Kontrolle aus Bl6-Tieren mit 0,25% deutlich unter diesem Wert. Diese Tendenzen setzten sich bei den wiederum älteren Mäusen von 18 Monaten in ähnlicher Weise fort.

Am deutlichsten ließen sich die Unterschiede der myopathischen Alterationen jedoch in den Gruppen der ältesten Tiere von 24 Monaten erkennen. Hier erreichten die IBM-Mäuse einen Mittelwert von 2,56%. Verglichen mit dem prozentualen Anteil an CNI der anderen Gruppen (Bl6 0,94%, IBM/iNOS-/- 1,16%, iNOS-/- 0,86%), ließ sich deutlich erkennen, dass die IBM-Tiere die meisten myopathischen Veränderungen aller 4 Gruppen entwickelt hatten. Dies entsprach auch dem lichtmikroskopischen Eindruck bei der Analyse der histologischen Schnitte.

Ein besonderes Augenmerk lag bei der Auswertung der Färbung auf dem Vergleich der Gruppen der IBM mit den IBM/iNOS-/- Tieren. Unterschiede zwischen den beiden genannten Tiergruppen können den Rückschluss zu lassen, dass die iNOS-Defizienz der wesentliche Auslöser solcher Differenzen sind. Dies lässt sich dadurch begründen, dass abgesehen von diesem spezifischen genetischen *knock-out* beide Gruppen genetisch äquivalent zueinander sind.

Bei einer solchen Gegenüberstellung für die 24 Monate alten Tiere beider Gruppen ließ sich eine signifikant höhere Anzahl an zentralisierten Kernen auf Seiten der IBM feststellen.

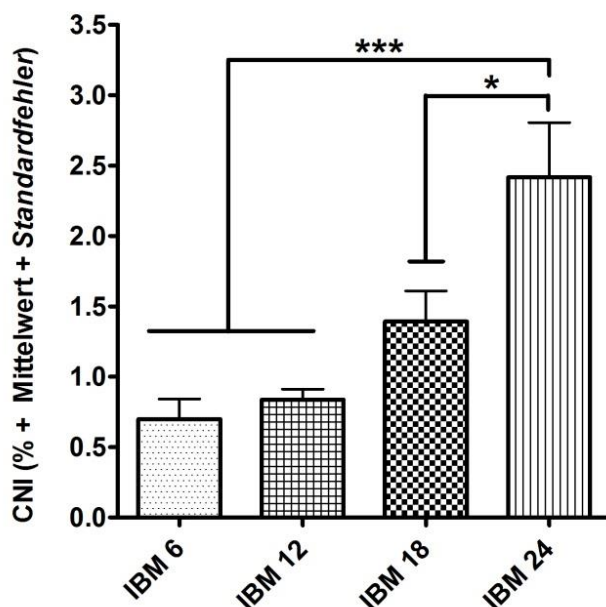


Abbildung 2: CNI(%) im zeitlichen Verlauf für die IBM-Tiere. Histologische Betrachtung an 6 (schwarz gepunktet), 12 (kariert), 18 (Schachbrettmuster) und 24 (gestreift, vertikal) Monate alten Mäusen

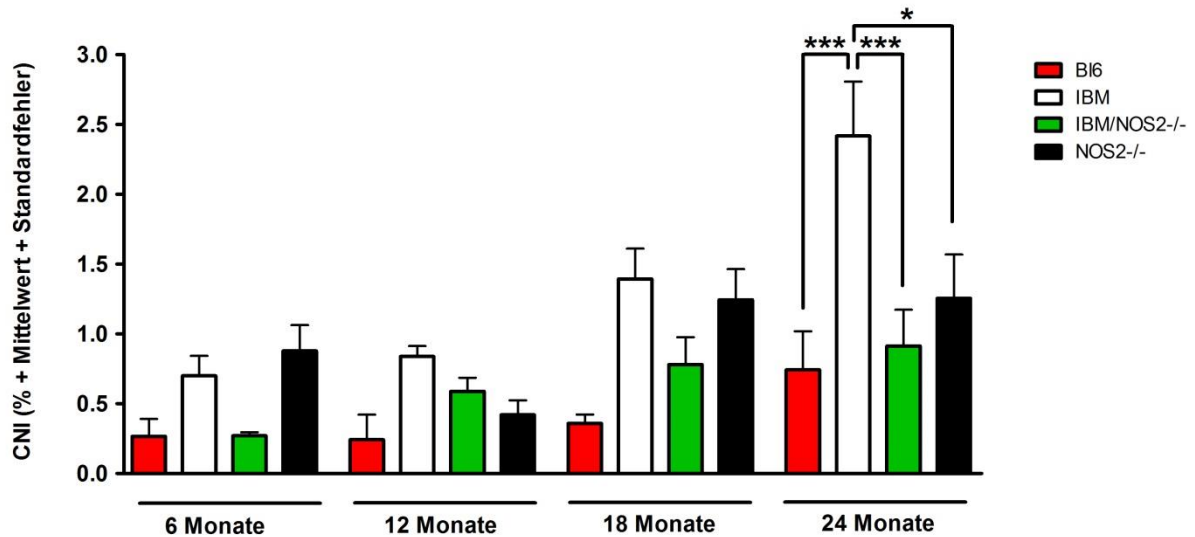


Abbildung 3: Darstellung des Parameters **CNI(%)** für die Altersgruppen 6, 12, 18 und 24 Monate alter Tiere. Kontrolle der Bl6 (rot), IBM-Tiere (weiß), IBM/iNOS^{-/-} (grün) und iNOS^{-/-} (schwarz). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Einen weiteren Parameter, der ausgewertet wurde, stellte der mittlere Faserdurchmesser sowie die Variation des mittleren Faserdurchmessers dar.

Hierbei ließen sich weder zwischen den genetisch verschiedenen Gruppen (Bl6, IBM, IBM/iNOS^{-/-}, iNOS^{-/-}) noch zwischen den vier Altersstufen (6, 12, 18 und 24 Monate alte Tiere) der jeweiligen Gruppen signifikante Unterschiede feststellen.

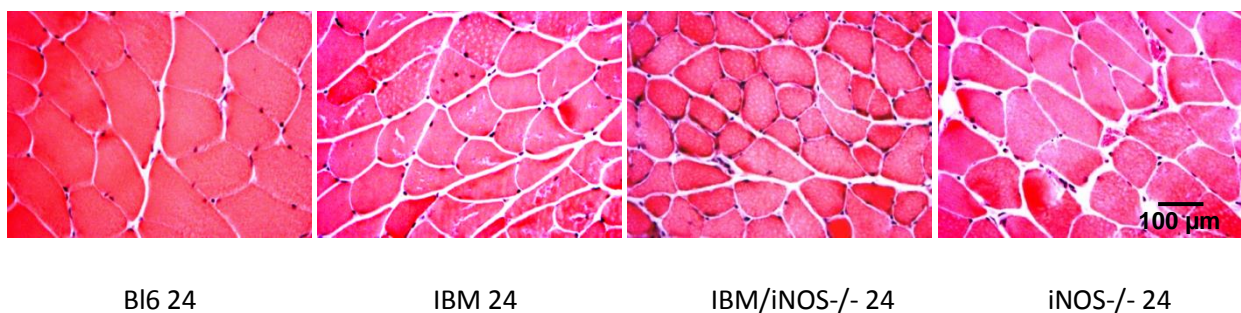


Abbildung 4: Histologische Schnitte 24 Monate alter Tiere in **Hämatoxylin- und Eosin-Färbung** (exemplarisch je 1 Bild pro Genotyp). Balken: 100 µm.

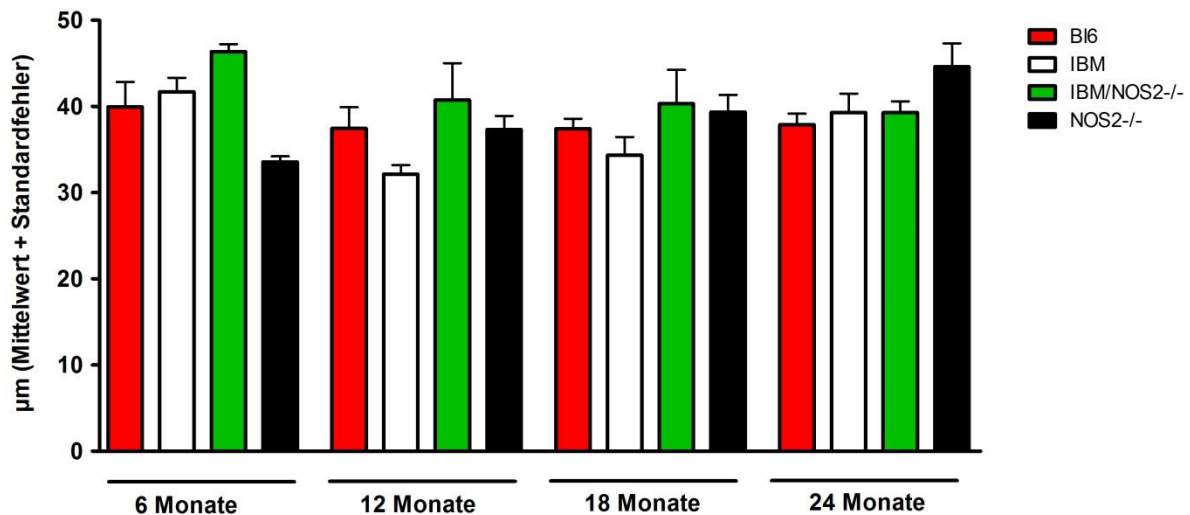


Abbildung 5: Darstellung des Parameters **mittlerer Faserdurchmesser** für alle Gruppen. Altergruppen von 6, 12, 18 und 24 Monate alten Tieren. Kontrollgruppe bestehend aus B6 (rot), IBM (weiß), IBM/iNOS^{-/-} (grün), iNOS^{-/-} (schwarz).

3.1.2 Keine objektivierbaren Veränderungen in der Fasertypen-Konfiguration

Zur Darstellung spezifischer Konstellationen und Verhältnisse der verschiedenen Muskelfaser-Typen wurde eine Fasertypen-Färbung an allen Tiergruppen durchgeführt. Im Rahmen myositischer Erkrankungen kann in vielen Fällen eine Dominanz der Typ I-Fasern sowie eine zunehmende Verminderung der Typ II-Muskelfasern beobachtet werden (Kuboyama et al. 2011).

In den durchgeführten Fasertypenfärbungen ließ sich zwischen den Gruppen verschiedenen Genotyps keine wesentliche Veränderung in der Zusammensetzung der verschiedenen Muskelfasern detektieren. Das Gesamtbild war in erster Linie durch Fasern des Typs IIa und gemischte Typen geprägt. Es soll auf die graphische und bildliche Darstellung der Fasertypen-Färbung bei mangelndem Informationsgehalt an dieser Stelle bewusst verzichtet werden.

3.2 Einfluss der iNOS-Defizienz auf die Inflammation

Zum Nachweis entzündlicher Vorgänge in den Muskelfasern der verschiedenen Tiergruppen wurden quantitative Polymerasekettenreaktionen sowie immunhistochemische Färbungen vorgenommen.

Die Zielgene der qPCR-Untersuchungen auf mRNA Ebene stellten Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) sowie β 2 Mikroglobulin (β 2M) dar. Bei diesen Markern handelt es sich um gängige Zytokine zum Nachweis entzündlicher Vorgänge in myositisch veränderten Muskelfasern (Venalis und Lundberg 2014). In der Immunhistochemie lag der Fokus auf der Markierung des *major histocompatibility*

complex 1 (MHC I), dem T-Zell spezifischen Transmembranprotein *cluster of differentiation 3* (CD 3) und dem Makrophagen anzeigenden Marker *macrophages 3* (MAC 3).

3.2.1 *iNOS*^{-/-} Tiere zeigen eine erhöhte mRNA-Expression von *IL-1 β* und *IL-6*

Bei der Ermittlung der mRNA-Expression der Entzündungsmarker Interleukin 1 β und Interleukin 6 mittels qPCR zeigte sich überraschend die deutlich höchste Expression in den Gruppen der *iNOS*^{-/-} Tiere. Dies ist graphisch in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt.

Der mögliche Erklärungsansatz, die *iNOS*-Defizienz könnte zur gesteigerten mRNA-Expression der verwendeten Marker geführt haben, erschien nicht ausreichend als Erklärung dieser Ergebnisse dienen zu können. Würde man von einer erhöhten mRNA-Expression aufgrund der *iNOS*-Defizienz ausgehen, so wäre dies folgerichtig ebenso für die Gruppe der IBM/*iNOS*^{-/-} Tiere zu erwarten gewesen. Hier konnten jedoch vergleichbare Ergebnisse nicht gezeigt werden. Vorangegangene Arbeiten zeigten jedoch bereits, dass abhängig von der Höhe der intrazellulären Menge an NO proinflammatorische Kaskaden aktiviert und entsprechende Marker chronischer Entzündung erhöht werden können. Dies ist in erster Linie in Forschungen zur Alzheimer-Erkrankung untersucht worden (Ridnour et al. 2004). Der vollständige *knock-out* der NO in den *iNOS*^{-/-} Tieren kann also die Entstehung der chronischen Entzündungsreaktion beeinflusst haben.

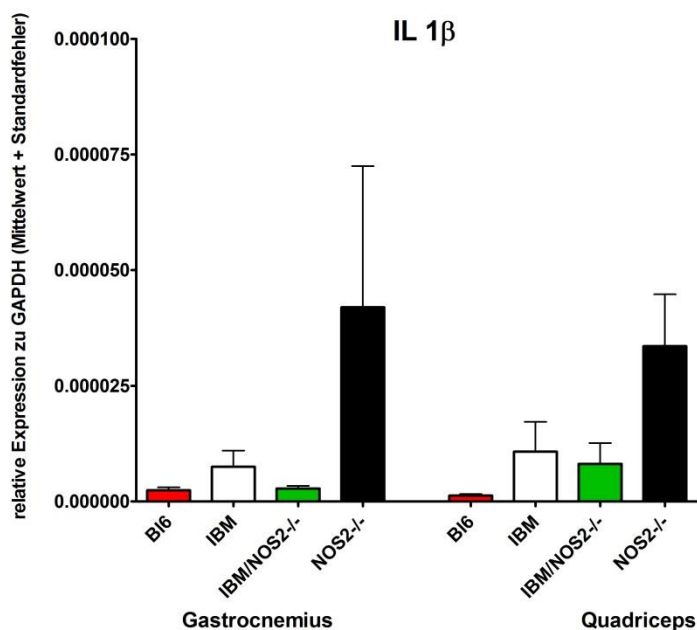


Abbildung 6: Ergebnisse der qPCR mit dem Marker *IL-1 β* für die 24 Monate alten Tiere aller Gruppen. Untersuchte Muskeln: Mm. Gastrocnemius et Quadriceps. Bl6-Kontrolle (rot), IBM (weiß), IBM/*iNOS*^{-/-} (grün) und *iNOS*^{-/-} (schwarz).

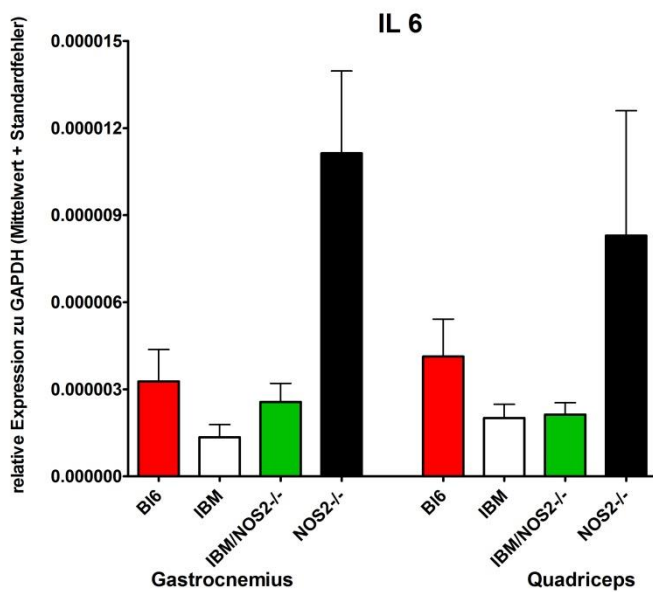


Abbildung 7: Ergebnisse der qPCR mit dem Marker **IL-6** für die 24 Monate alten Tiere aller Gruppen. Untersuchte Muskeln: Mm. Gastrocnemius et Quadriceps. Bl6-Kontrolle (rot), IBM (weiß), IBM/iNOS^{-/-} (grün) und iNOS^{-/-} (schwarz).

3.2.2 Unveränderte mRNA-Expression von β 2-Mikroglobulin

Die Höhe der mRNA-Expression für β 2-Mikroglobulin (β 2M) zeigte vergleichbare Ergebnisse für die jeweils gleichalten Tiere der Gruppen IBM, Bl6, IBM/iNOS^{-/-}, iNOS^{-/-}.

Leicht höhere Werte für die IBM-Tiere ließen sich lediglich in den ältesten Gruppen von 24 Monaten nachweisen, jedoch blieben die Differenzen auch an dieser Stelle deutlich unterhalb des Signifikanzniveaus.

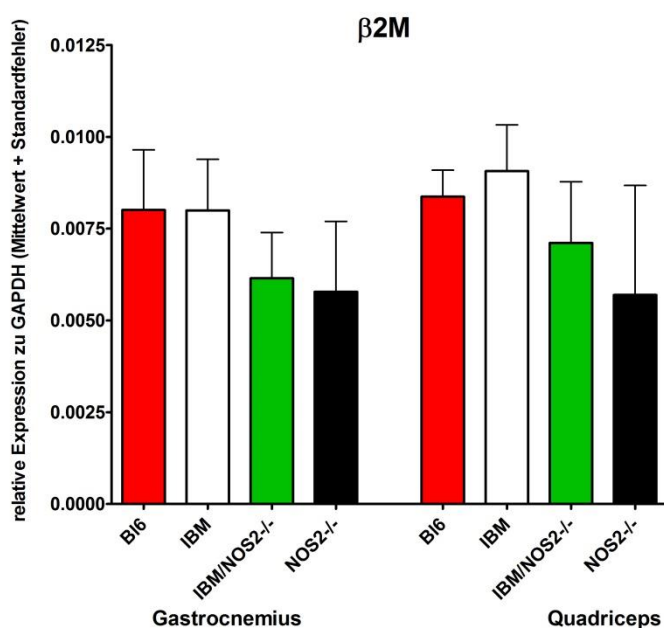


Abbildung 8: Ergebnisse der qPCR mit dem Marker **β 2M** für die 24 Monate alten Tiere aller Gruppen für die Mm. Gastrocnemius et Quadriceps. Bl6-Kontrolle (rot), IBM (weiß), IBM/iNOS^{-/-} (grün) und iNOS^{-/-} (schwarz).

3.2.3 *iNOS*^{-/-} ohne signifikante Veränderung in der MHC I-Expression

Die Signalstärke der MHC I-Färbung ließ sich insgesamt als relativ schwach bewerten. Zur Auswertung kam eine eigens entwickelte visuelle Skala zum Einsatz, nach welcher die Färbung einer definierten Anzahl von Muskelfasern pro Muskel einzeln bewertet und mithilfe eines Scores von 0-3 versehen wurde. Dies Verfahren ist im Teil „Material und Methoden“ dieser Arbeit im Detail beschrieben.

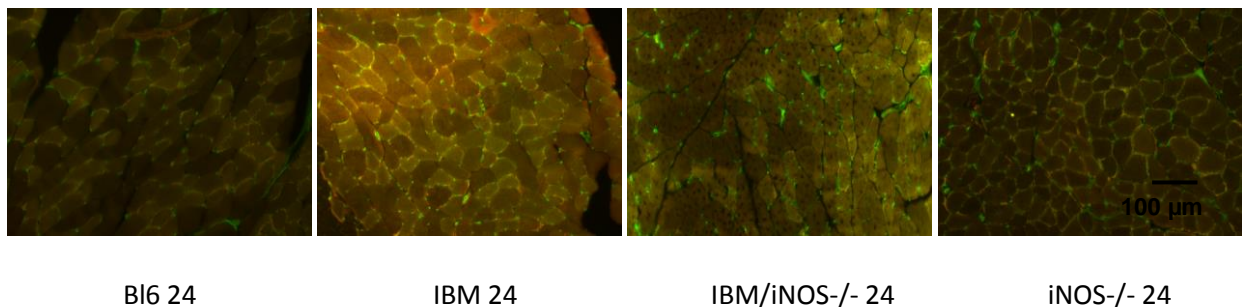


Abbildung 9: Histologische Schnitte 24 Monate alter Tiere in immunohistochemischer Färbung mit **MHC I** (MHC I = grünes Signal; exemplarisch je 1 Bild pro Genotyp; Vergrößerung 20x). Balken: 100 µm.

Hierbei zeigte sich die geringste Signalstärke in der Kontrollgruppe der BL6-Tiere. Zwischen den übrigen 3 Gruppen bestand weitgehend kein wesentlicher Unterschied, jedoch eine geringfügig höhere Summe MHC I-positiver Zellen auf Seiten der IBM-Mäuse. Auch im Falle der MHC I-Färbung war der direkte Vergleich der IBM-Gruppe mit der Gruppe der IBM/*iNOS*^{-/-} von besonderer Bedeutung. Eine Signifikanz ergab sich jedoch weder zwischen den genetisch differenten noch zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen der Tiere.

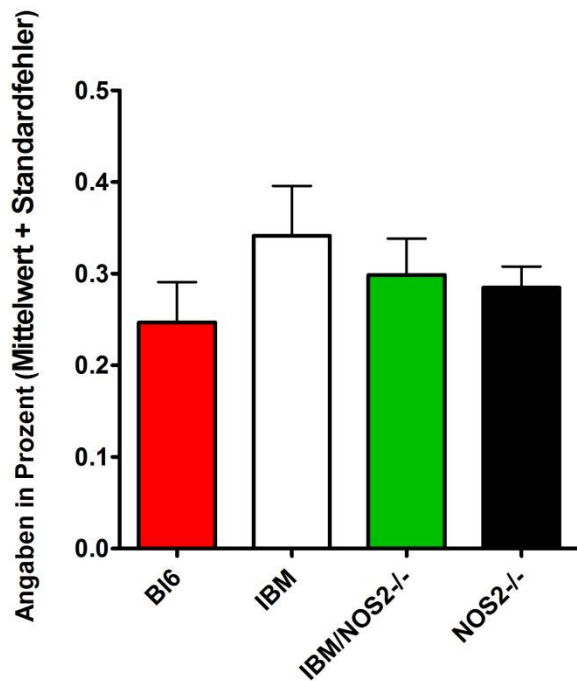


Abbildung 10: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von **MHC I** für die 24 Monate alten Tiere. Angabe der positiv angefärbten Zellen pro Muskel in Prozent. Bl6-Kontrolle (rot), IBM (weiß), IBM/iNOS2-/- (grün) und iNOS2-/- (schwarz).

3.2.4 Vermehrte T-Zellen und Makrophagen bei IBM-Tieren

Die CD3- sowie die MAC3-Färbungen wurden *pars pro toto* an den 24 Monate alten Tieren der verschiedenen Gruppen durchgeführt.

Hierbei wurde für jeden Muskel eine definierte Fläche von 41,6 mm², mikroskopisch kontrolliert mittels Schablone, ermittelt, analysiert und auf das Vorkommen der jeweils durch CD3 beziehungsweise MAC3 markierten Zellen untersucht. Aus Gründen der exakteren Betrachtung unter dem Mikroskop wurde die genannte Fläche in 4 Teileinheiten von jeweils 10,4 mm² unterteilt und mit 20-Facher Vergrößerung betrachtet. Die errechneten Mittelwerte beschrieben die Anzahl positiv angefärbter Zellen in den entsprechenden 10,4 mm² großen Abschnitten. Die IBM-Tiere zeigten etwas mehr CD3-positiv angefärbte T-Zellen als die anderen Gruppen. So belief sich der Mittelwert positiver Zellen bei den IBM-Mäusen auf 0,483 pro betrachtete Fläche. Hingegen zeigten sich lediglich 0,208 (Bl6), 0,167 (IBM*iNOS2*^{-/-}) und 0,333 (iNOS2^{-/-}) angefärbte T-Zellen in den anderen Gruppen.

Ähnliche Resultate ergaben sich für die MAC3-Färbung. Die IBM-Tiere erreichten pro Bildausschnitt einen Mittelwert von 0,417 positiv angefärbten Makrophagen. Die durchschnittliche Anzahl an angefärbten Zielzellen in den anderen Gruppen belief sich auf 0,125 (Bl6), 0,250 (IBM*iNOS2*^{-/-}) und 0,167 (iNOS2^{-/-}). Signifikante Unterschiede zwischen den genetisch verschiedenen Gruppen ließen sich jedoch nicht feststellen.

Bei farblich verhältnismäßig blass durchgeführter Färbung wurde an dieser Stelle bewusst auf die Präsentation von Bildern verzichtet und sich auf die Darstellung der Ergebnisse mittels folgender Graphen beschränkt.

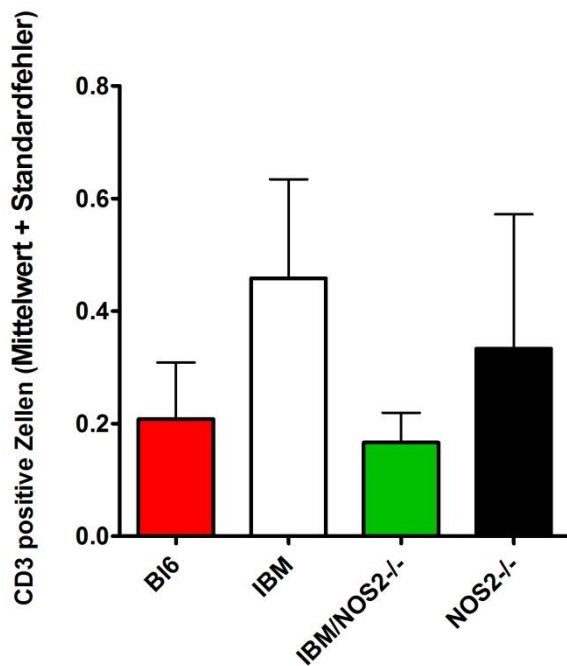


Abbildung 11: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von **T-Zellen (CD3)** für die 24 Monate alten Tiere. Angabe der positiv angefärbten Zellen pro 10,4 mm² Fläche. B16-Kontrolle (rot), IBM (weiß), IBM/iNOS^{-/-} (grün) und iNOS^{-/-} (schwarz).

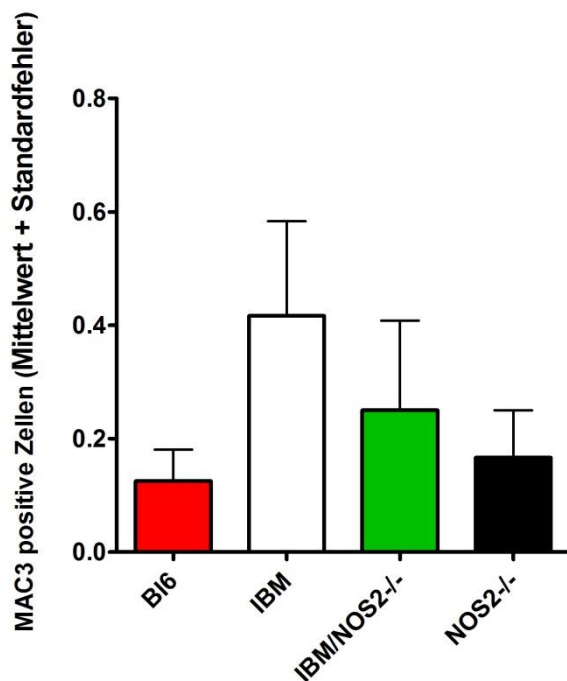


Abbildung 12: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von **Makrophagen (MAC3)** für die 24 Monate alten Tiere. Angabe der positiv angefärbten Zellen pro 10,4 mm² Fläche. B16-Kontrolle (rot), IBM (weiß), IBM/iNOS^{-/-} (grün) und iNOS^{-/-} (schwarz).

3.3 Aggregationen

Zum Nachweis IBM-typischer intrazellulärer Protein-Aggregate wurden sowohl quantitative Polymerasekettenreaktionen (qPCR) als auch immunhistochemische Färbungen verwendet.

Auf Ebene der mRNA-Expression diente der Aggregationsmarker Amyloid Precursor Protein (APP) der Untersuchung möglicher gesteigerter oder verminderter Proteinansammlungen.

In der Immunhistochemie wurde zum einen das humane Amyloid Precursor Protein (hAPP) und zum anderen Amyloid spezifisch angefärbt.

3.3.1 *iNOS*^{-/-} Tiere zeigen eine erhöhte Expression von APP

Entsprechend den Ergebnissen der mRNA-Expression von IL-1 β und IL-6 zeigte sich erneut, dass die Gruppe der *iNOS*^{-/-} Tiere vor allem in der Altersstufe von 24 Monaten deutlich höhere Werte erreichte als alle anderen Tiere differenten Genotyps. Die Ergebnisse ließen sich bei wiederholter qPCR reproduzieren und zeigten ähnliche Tendenzen auch in den Altersgruppen von 12 und 18 Monate alten Mäusen.

Zwischen den restlichen Gruppen aus B16, IBM/*iNOS*^{-/-} und IBM bestanden keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression von APP.

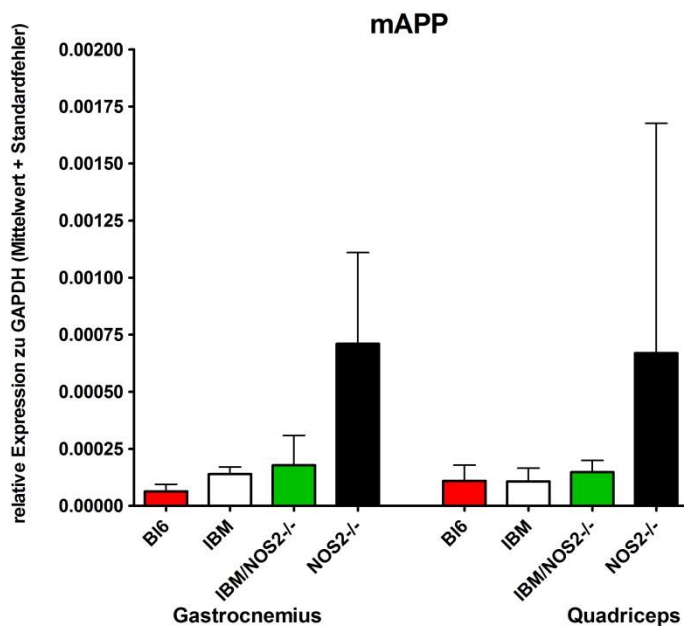


Abbildung 13: Ergebnisse der qPCR mit dem Marker **mAPP** für die 24 Monate alten Tiere aller Gruppen für die Mm. Gastrocnemius et Quadriceps. B16-Kontrolle (rot), IBM (weiß), IBM/*iNOS*^{-/-} (grün) und *iNOS*^{-/-} (schwarz).

3.3.2 Keine wesentlichen Unterschiede in der APP-Färbung

In der immunhistochemischen Färbung des humanen APP (hAPP) zeigten sich zwischen den genetisch differenten Tieren wie auch zwischen den verschiedenen Altersgruppen keine wesentlichen Unterschiede.

Die Färbung der Proben ließ sich insgesamt als schwach beschreiben. Auch bei Wiederholung unter exakter Beachtung der korrekten Ausführung des entsprechenden Färbe-Protokolls konnte die Signalstärke nicht erhöht werden. Die Auswertung erfolgte, wie im Abschnitt „Material und Methoden“ exakter beschrieben, anhand eines selbstentwickelten Scores mit den Zahlenwerten 0-3. Zusätzlich wurde eine Negativ-Kontrolle ohne Zugabe des Sekundärantikörpers durchgeführt. Die entsprechende APP-Färbung ist in Abbildung 17 exemplarisch gezeigt sowie in Abbildung 18 die Auswertung der 24 Monate alten Tiergruppen.

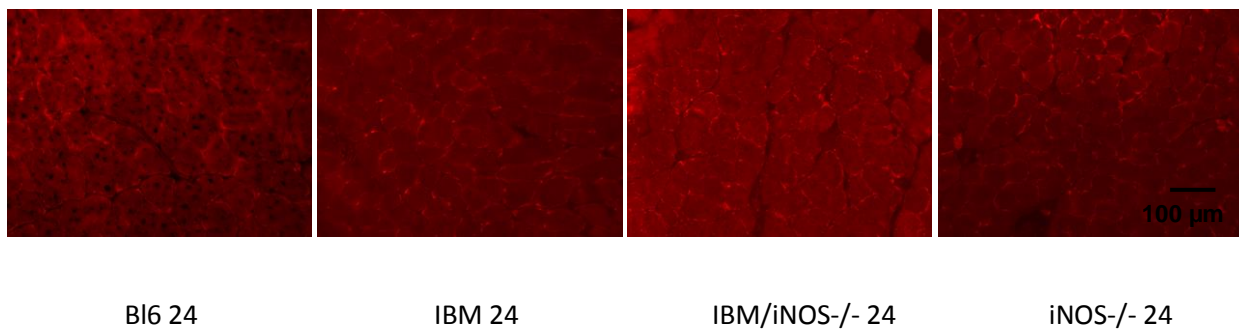


Abbildung 14: Histologische Schnitte 24 Monate alter Tiere in immunhistochemischer Färbung mit humanen **APP** (exemplarisch je 1 Bild pro Genotyp; Vergrößerung 20x). Balken: 100 µm.

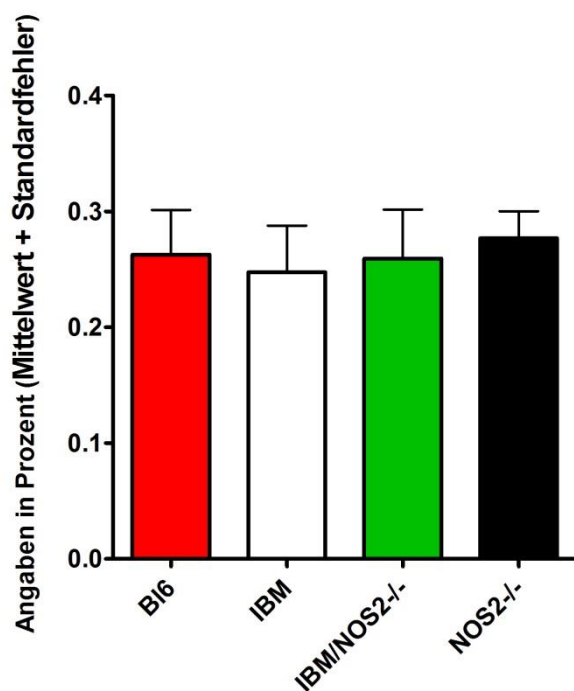


Abbildung 15: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von humanen **APP** für die 24 Monate alten Tiere der 4 genotypisch verschiedenen Gruppen. Bl6-Kontrolle (rot), IBM (weiß), IBM/iNOS^{-/-} (grün) und iNOS^{-/-} (schwarz).

3.3.3 IBM/iNOS^{-/-} zeigen deutlich verminderte Aggregation von Amyloid mittels ThioflavinS-Färbung

Die ThioflavinS-Färbung diente der Anfärbung von Amyloid in den untersuchten Muskelfasern. Die Auswertung der ThioflavinS-Färbung erfolgte mittels Graustufen-Analyse mithilfe des Programms ImageJ. Verwendet wurde ein eigens für diese Methode geschriebenes Skript, welches ermöglichte, alle zuvor fotografierten Schnitte einer Altersstufe und genetisch identischen Gruppe unter gleichen Bedingungen und zum selben Zeitpunkt zu analysieren.

Es ließ sich anhand der ThioflavinS-Färbung feststellen, dass die Gesamtmenge von Amyloid in allen Gruppen altersabhängig deutlich zunehmend war. Bei der Kontrollgruppe von Bl6-Mäusen ergab sich eine angefärbte „%Area“ von lediglich 0,248% (Mittelwert) für die 6 Monate alten Tiere. Diese stieg bis auf 5,982% bei den 24 Monate alten Tieren an, sodass sich hier eine altersabhängige Zunahme an Amyloid um den Faktor 24,12 verzeichnen ließ. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für die Gruppe der IBM-Tiere, wo ein ebenfalls deutlicher Anstieg von 3,365% (6 Monate) auf 15,996% (24 Monate) stattfand. Ebenso zeigte die „%Area“ bei den IBM/iNOS^{-/-} Tieren eine Erhöhung von 0,829% (6 Monate) auf 8,533% (24 Monate). Ebenso war bei den iNOS^{-/-} Mäusen eine vergleichbare Elevation deutlich erkennbar. Diese erstreckte sich von 0,259% (6 Monate) bis hin zu 6,888% (24 Monate), sodass auch an dieser Stelle der Trend der anderen Gruppen fortgesetzt wurde. Diese Ergebnisse werden durch die Abbildungen 20 und 21 widergespiegelt.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass die IBM-Tiere in allen Altersgruppen ein wesentlich höheres quantitatives Maß an Amyloid aufwiesen als die jeweils verglichenen Tiere der Gruppen aus Bl6, IBM/iNOS^{-/-} und iNOS^{-/-} desselben Alters. So konnte ein deutlicher Unterschied bereits bei den jüngsten Tieren von 6 Monaten festgestellt werden, welcher sich sogar noch gesteigert bei höherem Lebensalter zeigte.

Besonderes Augenmerk lag wie auch bereits bei der Hämatoxylin- und Eosin-Färbung auf dem Vergleich zwischen der IBM-Gruppe mit den IBM/iNOS^{-/-} - Tieren, um eine mögliche Einflussnahme der iNOS-Defizienz in Bezug auf die Progression myopathischer Erkrankungen wie der Einschlusskörpermyositis herauszuarbeiten. In allen 4 Altersstufen von 6 bis 24 Monate alten Tieren war festzustellen, dass die IBM-Tiere deutlich mehr Amyloid zeigten als die entsprechenden IBM/iNOS^{-/-} Tiere. Hochsignifikante Werte wurden unter anderem beim Vergleich der jeweils ältesten Tiere (24 Monate) beider Gruppen erreicht, wo sich eine „%Area“ von 15,996% bei den IBM-Mäusen und ein Wert von 8,533% für die IBM/iNOS^{-/-} - Tiere ergab.

Die mittels der ThioflavinS-Färbung ermittelten Ergebnisse bezüglich des alterskorrelierten Anstieges des Amyloid-Signals in allen Gruppen sowie der deutlichen Differenz zwischen IBM- und IBM/iNOS^{-/-} Tieren zeigten deutliche Parallelen zu den Resultaten der zuvor beschriebenen Hämatoxylin- und Eosin-Färbung auf. Die in der Hämatoxylin- und Eosin-Färbung nachgewiesenen myopathischen Alterationen zeigten sich in den IBM-Tieren signifikant stärker ausgeprägt als in den jeweils altersgleichen IBM/iNOS^{-/-} Gruppen.

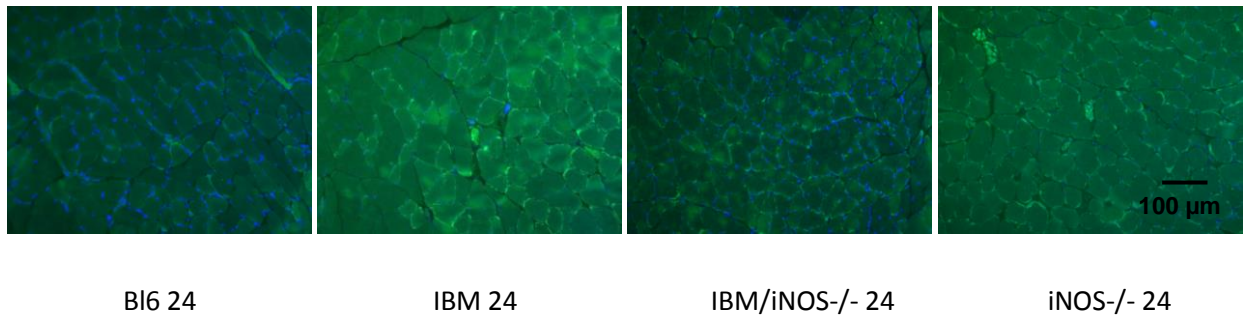


Abbildung 16: Histologische Schnitte 24 Monate alter Tiere in immunhistochemischer Färbung mit **ThioflavinS** (exemplarisch je 1 Bild pro Genotyp; Vergrößerung 20x). Balken: 100 µm.

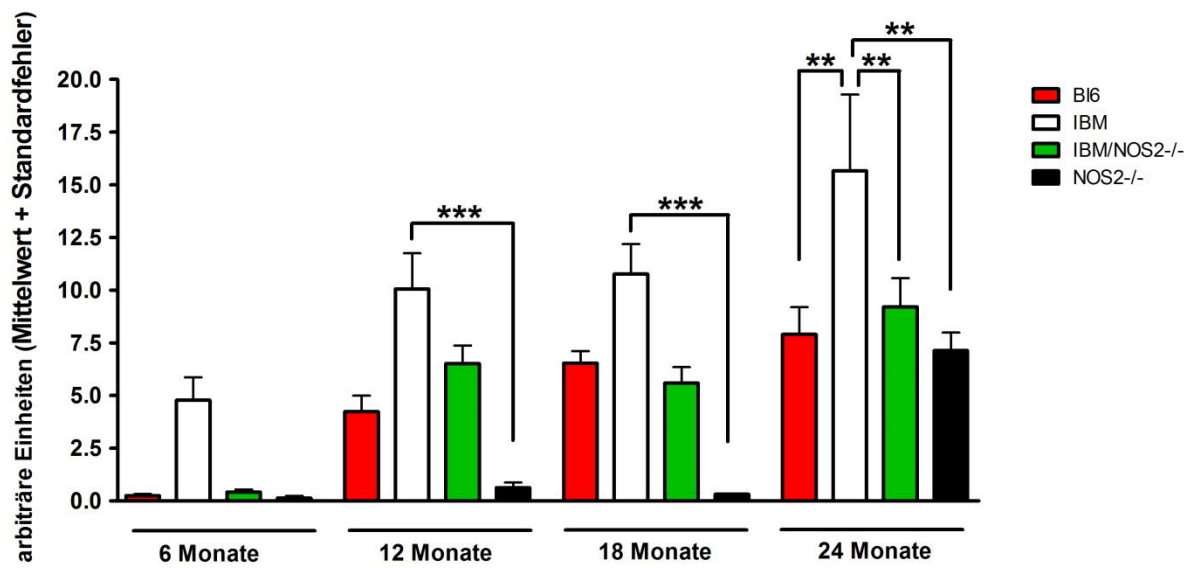


Abbildung 17: Ergebnisse der **ThioflavinS**-Färbung. Altersgruppen von 6, 12, 18 und 24 Monate alten Tieren. BI6-Kontrolle (rot), IBM (weiß), IBM/iNOS-/- (grün) und iNOS-/- (schwarz). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

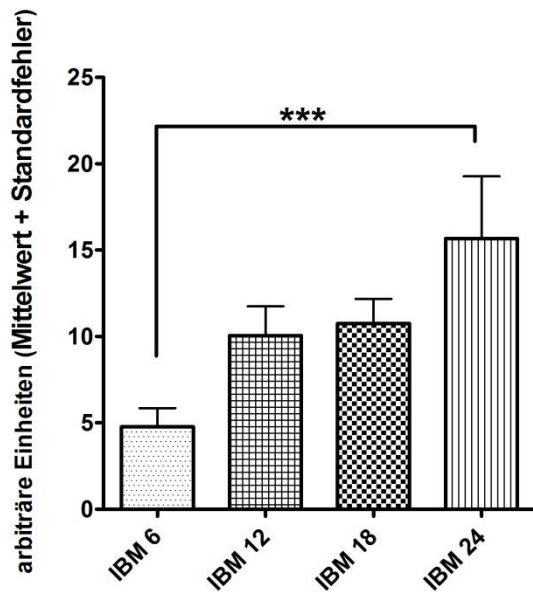


Abbildung 18: Alterskorrelierte Zunahme der β -Amyloid-Aggregate im zeitlichen Verlauf für die IBM-Tiere. Histologische Betrachtung an 6 (schwarz gepunktet), 12 (kariert), 18 (Schachbrettmuster) und 24 (gestreift, vertikal) Monaten alten Mäusen. Anfärbung mit **ThioflavinS**.

3.4 Oxidativer Stress

Zum Nachweis von oxidativem Stress, im Falle der Einschlusskörpermyositis treffender als Stickstoffmonoxid-Stress (NO-Stress) zu bezeichnen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Methoden der quantitativen Polymerasekettenreaktion des Western Blots (WB) und der Immunhistochemie verwendet.

Als Marker des NO-Stresses auf Ebene der mRNA-Expression diente die *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) in Bezug zum *housekeeping-gene* GAPDH als Marker.

Auf Proteinebene erfolgten Untersuchungen mittels *western blot* für Nitrotyrosin und immunhistochemisch wurden sowohl spezifische Färbungen für Nitrotyrosin als auch für iNOS vorgenommen. Hierbei handelt es sich sowohl bei Nitrotyrosin als auch iNOS um etablierte Parameter und Marker des oxidativen Stresses (Bayir et al. 2005).

3.4.1 iNOS auf mRNA-Expressionsebene nicht einheitlich nachweisbar

Die mRNA-Expressionsrate der iNOS konnte lediglich in wenigen Proben nachgewiesen werden. Es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den genetisch verschiedenen Mauslinien. Eine Analyse und Visualisierung der Ergebnisse ließ sich nicht sinnvoll realisieren, da stets ein Teil der getesteten cDNA nicht detektierbare Resultate erbrachte und somit keine zahlenmäßige Gleichheit zwischen den Versuchsgruppen gewährleistet gewesen wäre.

3.4.2 Schwaches Signal in der iNOS- und Nitrotyrosin-Färbung

Die Anfärbung von Nitrotyrosin und iNOS diente dem Nachweis von NO-Stress, welcher bei der Einschlusskörpermyositis im Vergleich mit ähnlichen myopathischen Erkrankungen wie der Dermatomyositis oder Polymyositis typisch wäre. Die Färbungen für Nitrotyrosin und iNOS zeigten insgesamt ein relativ schwaches Signal. Sie wurden mittels Graustufen-Analyse unter Verwendung des Programmes ImageJ ausgewertet.

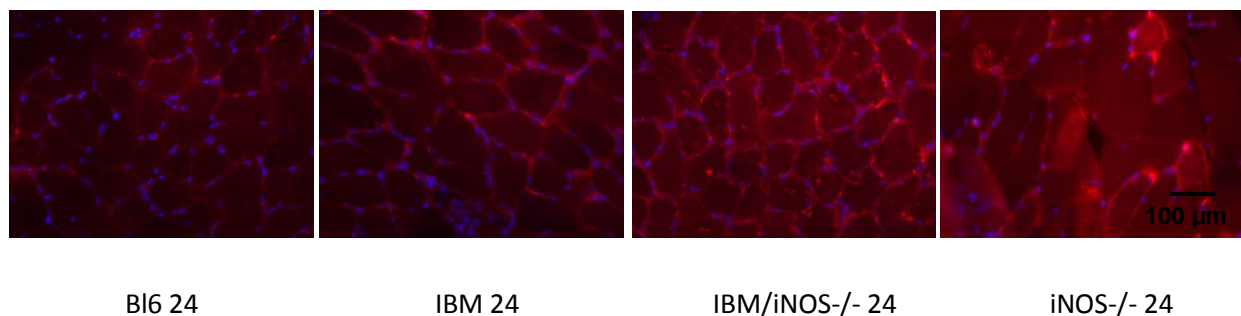


Abbildung 19: Histologische Schnitte 24 Monate alter Tiere in immunhistochemischer Färbung mit **Nitrotyrosin** (exemplarisch je 1 Bild pro Genotyp; Vergrößerung 20x). Balken: 100 µm.

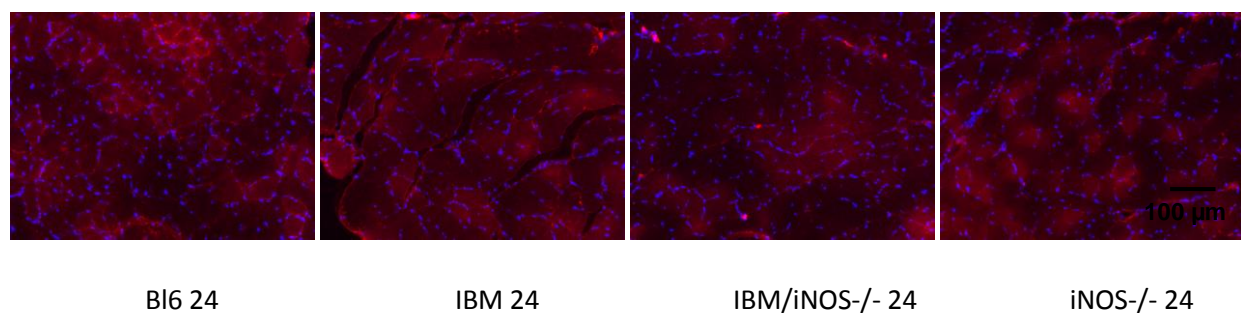


Abbildung 20: Histologische Schnitte 24 Monate alter Tiere in immunhistochemischer Färbung mit **iNOS** (exemplarisch je 1 Bild pro Genotyp; Vergrößerung 20x). Balken: 100 µm.

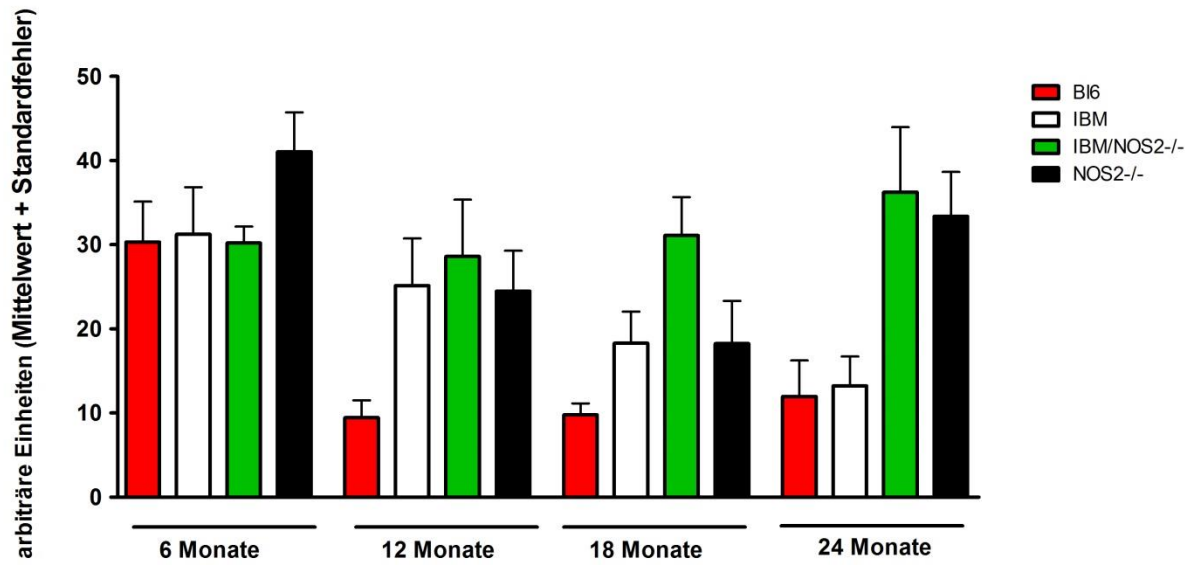


Abbildung 21: Ergebnisse der Nitrotyrosin-Färbung für alle Gruppen. Altersgruppen von 6, 12, 18 und 24 Monate alten Mäusen. B16-Kontrolle (rot), IBM (weiß), IBM/iNOS2-/- (grün) und iNOS2-/- (schwarz).

4. Diskussion

Die Einschlusskörpermyositis ist die häufigste Myopathie des älteren Menschen jenseits des 50. Lebensjahres und lässt sich als eine langsam voranschreitende, entzündliche Muskelerkrankung beschreiben (Breithaupt und Schmidt 2014). Die Pathomechanismen der Einschlusskörpermyositis sind bis zum heutigen Tage nicht vollends geklärt, jedoch kann von einem Zusammenspiel zwischen entzündlichen und degenerativen Veränderungen ausgegangen werden (Schmidt et al. 2012). Eine Hochregulation von iNOS konnte in Muskelzellen durch Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen erreicht werden. In der Folge kam es zu vermehrten Protein-Akkumulationen sowie zu einem beschleunigten, Nekrose-assoziierten Zelltod. Die pharmakologische Inhibition der iNOS, beispielsweise durch das Pharmakon *W1400*, konnte solche Effekte deutlich vermindern und legte somit eine relevante Rolle von NO-Stress in der Pathogenese der Einschlusskörpermyositis nahe (Schmidt et al. 2012). In vorangegangenen tierexperimentellen Arbeiten zeigten sich darüber hinaus wesentliche Unterschiede in Verlaufsparemtern der physischen Leistungsfähigkeit. So präsentierten 12 bis 24 Monate alte IBM-Mäuse im Vergleich zu gleichaltrigen Tieren der IBM/iNOS-/- Gruppe deutlich verminderte kumulative Laufleistungen sowie eine leicht reduzierte Greifkraft (Voigt und Weller 2011).

Die vorliegende Arbeit diene in erster Linie der Klärung des Einflusses eines *knock-outs* der iNOS auf die Muskelpathologie der experimentellen IBM. Zusätzlich sollten mit dieser Arbeit mögliche Defizite des verwendeten IBM-Mausmodells hinsichtlich der Erforschung der IBM untersucht werden. Die Etablierung des Modells erfolgte einige Jahre zuvor (Kitazawa et al. 2006).

Bezüglich der Kernfrage, inwieweit eine Defizienz der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase einen protektiven Einfluss auf die Progression der Einschlusskörpermyositis besitzt, müssen die vorliegenden Ergebnisse im Einzelnen betrachtet werden. Es ist in früheren Forschungsarbeiten bereits nachgewiesen worden, dass ein Zusammenhang in der Hochregulation der intrazellulären iNOS und der vermehrten Bildung von β -Amyloid-Aggregationen besteht (Schmidt et al. 2012). Auch im Bereich der Erforschung der Alzheimer Krankheit konnten sowohl cytoprotektive als auch cytodestruierende Einflüsse des Enzyms iNOS herausgearbeitet werden. Hier schien der Effekt der iNOS in erster Linie von der Quantität der intrazellulären NO-Menge abhängig zu sein (Colton et al. 2008).

Hinsichtlich eines gesteigerten oder verminderten Anteils an Entzündungszeichen bei den IBM-Tieren, insbesondere im Vergleich zu den Mäusen der IBM/iNOS-/- Gruppe, ließen sich nur geringe Unterschiede feststellen. Hier konnten beispielsweise keine wesentlichen Differenzen in den Ergebnissen der mRNA-Expression für Entzündungsmarker wie IL-1 β , IL-6 und β 2M gezeigt werden.

In Bezug auf entzündliche Veränderungen liegen jedoch vorangegangene Arbeiten an humanen Muskelzellen vor, welche eine Steigerung der Expression verschiedener Entzündungsmarker wie IL-1 β und TGF- β im Vergleich der Gruppen der IBM- und der B16-Tiere nachweisen konnten (Dalakas 2006). Hinsichtlich des Vergleiches von IBM und iNOS *knock-out*-Tieren liegen jedoch bislang keine

entsprechenden Daten vor, welche sich mit denen dieser Arbeit vergleichen ließen. Die iNOS^{-/-} Tiere wiesen in den hier erhobenen Daten erhöhte Entzündungsparameter, im Vergleich mit der Kontrollgruppe der B16- und der IBM-Mäuse, auf.

Die Invasion der Muskelgewebe-Proben durch proinflammatorische Zellen offenbarte keine deutlichen Unterschiede zwischen den vier genotypisch verschiedenen Tiergruppen, welche im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden. So zeigten sich die Resultate der T-Zell- und Makrophagen-Färbungen vergleichbar, was sich anhand der Anzahl der entsprechenden proinflammatorischen Zellen zeigen ließ. So fanden sich im Mittel bei den IBM-Mäusen 0,483 positive Zellen pro inspizierte Fläche, während sich bei den anderen Gruppen geringere Anzahlen zwischen 0,167 (IBMiNOS^{-/-}) und 0,333 (iNOS^{-/-}) angefärbte T-Zellen nachweisen ließen. Ähnliche Ergebnisse zeigte die immunhistochemische Nachweisfärbung der Makrophagen. Bei der Zusammensetzung der verschiedenen Muskelfasertypen via immunhistochemischer Fasertypen-Färbung ergaben sich keine erkennbaren Differenzen zwischen den Gruppen.

Hinsichtlich des Nachweises von NO-Stress anhand der durchgeführten Nitrotyrosin- und iNOS-Färbungen ließen sich ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede zwischen IBM und IBM/iNOS^{-/-} Tieren belegen. Ebenso erbrachte die Durchführung mehrerer Western Blots zum Nachweis von Nitrotyrosin keinen Zugewinn an Erkenntnis über die Expression von Nitrotyrosin auf Proteinebene. Es wird davon ausgegangen, dass die Hochregulation proinflammatorischer Zytokine in direktem Zusammenhang mit der intrazellulären Entstehung von NO-Stress steht (Schmidt et al. 2012). Somit kann es als folgerichtig bewertet werden, dass eine Steigerung des NO-Stresses ausblieb, bei gleichermaßen fehlender Erhöhung der mRNA-Expression von Entzündungsmarkern wie IL-1 β , IL-6 und β 2M.

Im Gegensatz zu den genannten Methoden erbrachte jedoch die Hämatoxylin- und Eosin-Färbung sehr eindeutige Resultate, die für einen protektiven Effekt der iNOS-Defizienz bezüglich der Progression der Einschlusskörpermyositis sprechen. Zur Analyse myopathischer Alterationen von Muskelfasern wurden etablierte Kriterien herangezogen, welche die Varianz des mittleren Faserdurchmessers sowie den prozentualen Anteil internalisierter Nuclei (CNI%) an allen Zellkernen umfassen (Arnardottir 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die typischen myopathischen Veränderungen in der Gruppe der IBM-Tiere weit stärker vorhanden waren und zudem erheblich schneller voranschritten als in allen anderen Gruppen. Diese Ergebnisse entsprechen denen früherer Untersuchungen mittels Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen am IBM-Mausmodell (Kitazawa et al. 2006). Zusätzlich präsentierten alle Gruppen einen alterskorrelierten Zuwachs an solchen myopathischen Veränderungen. Zudem gilt es zu erwähnen, dass sich in den Geweben der IBM/iNOS^{-/-} mehr myopathische Zeichen als in der Kontrollgruppe aus B16-Tieren finden ließen. Das Ausmaß myopathischer Alterationen bei der Gruppe der IBM/iNOS^{-/-} Tiere nahm somit eine Mittelstellung zwischen den gering ausgeprägten Veränderungen der B16-Tiere und den deutlich ausgeprägten Veränderungen der IBM-Tiere ein. Als besonders interessantes Ergebnis stellte sich diesbezüglich der intensivere Vergleich zwischen den Gruppen der IBM und der IBM/iNOS^{-/-} dar. Hier wurde deutlich, dass die iNOS-Defizienz die Ausprägung myopathischer Alterationen bei den IBM/iNOS^{-/-} in allen Altersstufen reduzierte und die Muskelproben einen wesentlich geringeren

prozentualen Anteil an zentralisierten Nuclei aufwiesen als die Proben der IBM-Gruppe. An dieser Stelle wurden hochsignifikante Unterschiede offenkundig, welche deutlich die Hypothese eines positiven respektive protektiven Effektes der iNOS-Defizienz auf den Krankheitsverlauf im Mausmodell stützen.

Des Weiteren konnte aufgrund der durchgeführten ThioflavinS-Färbungen nachgewiesen werden, dass die Dichte und Häufigkeit von β -Amyloid-Aggregaten in den IBM-Tieren ein deutlich höheres Ausmaß erreichte als in den anderen Gruppen. Auch hier zeigte sich insgesamt eine Zunahme von Aggregationen mit zunehmendem Alter der Versuchstiere. Dieses Ergebnis ließ sich für alle vier Tiergruppen verdeutlichen. Passend zu den Resultaten der Hämatoxylin- und Eosin-Färbung präsentierten die Muskelproben der IBM-Tiere deutlich mehr Akkumulationen IBM-typischer Proteine als die altersgleichen Proben der IBM/iNOS-/- Mäuse. Auch hier konnte somit davon ausgegangen werden, dass bei ansonsten genetischer Äquivalenz beider Gruppen die iNOS-Defizienz der letztgenannten Tiere zu diesem Unterschied führte. Zusammenhänge zwischen der Akkumulation von β -Amyloid und der Höhe des intrazellulären NO, synthetisiert durch die iNOS, wurde bereits in Arbeiten zur Alzheimer-Krankheit angenommen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine hohe große Menge an β -Amyloid zu einem verminderten NO-Gehalt in den untersuchten Proben führte. Verwendet wurde für diese Forschungen ebenso wie in der vorliegenden Arbeit ein Mausmodell mit genetischem *knock-out* der iNOS (Colton et al. 2008). Die Relevanz des intrazellulären NO bei der Entstehung von Amyloid beziehungsweise der Progression bereits vorhandener Aggregate ließ sich somit anhand der vorliegenden Ergebnisse unterstreichen.

In Übereinstimmung der Ergebnisse der Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen ist zusammenfassend davon auszugehen, dass die Defizienz der NO-Synthetase hinsichtlich Proteinaggregation sowie myopathischer Veränderungen einen Schutzeffekt für die Progression der Einschlusskörpermyositis besitzt. Dieser Effekt ließ sich in dieser Arbeit jedoch in dieser Deutlichkeit für entzündliche Vorgänge sowie für die Auswirkung auf die Stärke des entstehenden NO-Stresses nicht nachweisen.

Bezüglich der Fragestellung, inwieweit das verwendete IBM-Mausmodell zur Erforschung der Einschlusskörpermyositis auf allen Gebieten geeignet ist, müssen erneut die verschiedenen Ergebnisse differenziert betrachtet werden.

Es zeigte sich, dass hinsichtlich der mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmarker wie IL-1 β , IL-6 und β 2M keine wesentlichen Unterschiede zwischen den IBM-Tieren und denen der Kontrollgruppe aus B16 sowie der Vergleichsgruppe von IBM/iNOS-/- Mäusen bestanden. Anlässlich der myositischen Komponente wäre in diesen Fällen eine Steigerung der mRNA-Expression bei den IBM und IBM/iNOS-/- Tieren zu erwarten gewesen. Ebenfalls wenige Differenzen zeigten sich bei den T-Lymphozyten -und Makrophagen-Färbungen, wobei alle Gruppen lediglich geringe Infiltrationen genannter Entzündungszellen präsentierten. Diese Resultate wiederum passten zu der fehlenden Erhöhung der mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine.

Hinsichtlich der Einschlusskörpermyositis bestätigte sich somit der vorbeschriebene vermutete Mechanismus, dass die Entstehung der Entzündung bei der IBM vor der Bildung entsprechenden β -

Amyloids vonstattengeht (Schmidt et al. 2008). Umgekehrt schien eine, wie oben beschrieben, bereits vorhandene Aggregatbildung von Amyloid nicht alleinig ausreichend, um eine konsekutive Entzündung zu bewirken. Einzig in der iNOS-/- Gruppe konnten erhöhte Parameter der chronischen Entzündungsreaktion beobachtet werden. Auch in vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl eine erhöhte als auch eine stark verminderte Menge intrazellulären Stickstoffmonoxids einen direkten Einfluss auf die Entstehung und Unterhaltung entzündlicher Vorgänge besaß (Colton et al. 2008). Insbesondere die Erniedrigung der intrazellulären Menge an NO führte in genannten Studien zu einer deutlichen Verschlechterung β -Amyloid-vermittelter Krankheitsbilder wie der Alzheimer-Erkrankung. Ebenso erschien die Erhaltung einer variablen Mindestmenge an NO protektive Einflüsse auf Entzündungsgeschehen und Degeneration zu besitzen.

Hinsichtlich des Nachweises von Stickstoffmonoxid-Stress wurden immunhistochemische Färbungen für iNOS- und Nitrotyrosin an den Gruppen verschiedenen Genotyps durchgeführt. Abgesehen von der insgesamt als schwach zu bewertenden Signalstärke beider Färbungen, konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Tiergruppen gezeigt werden. Bei bereits beschriebenem Zusammenhang zwischen Entzündung und der Entstehung von Stickstoffmonoxid-Stress waren diese Ergebnisse folgerichtig zu erwarten (Schmidt et al. 2012). Zusätzlich stellten sich die Resultate zum NO-Stress als wenig konstant über den Altersverlauf der Gruppen dar, was die Interpretation weiter erschwerte.

Auf der anderen Seite konnten vor allem bezüglich der Nachweise von Aggregationen und myopathischen Veränderungen mit dem verwendeten IBM-Mausmodell eindeutige und plausible Ergebnisse erzielt werden. So zeigte sich beispielsweise in den IBM-Tieren via quantitativer Polymerasekettenreaktion eine leicht erhöhte mRNA-Expression des Aggregationsmarkers *mouse APP* (mAPP) im Vergleich zu den anderen Gruppen. Überraschenderweise konnte hingegen sowohl mittels immunhistochemischer Nachweismethoden als auch via qPCR keine wesentliche Expression von *human APP* (hAPP) gezeigt werden. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte die fehlende Sensitivität der gewählten Verfahren zur Detektion des APP sein. Eine weitere mögliche Ursache der scheinbar fehlenden Expression von hAPP könnte eine mangelnde Transkription sein, sodass hier von einem Defizit des IBM-Mausmodells auszugehen wäre.

Sehr viel deutlicher noch konnten die gesteigerte β -Amyloid-Akkumulationen in der ThioflavinS-Färbung beobachtet werden. Hier präsentierte sich eine deutlich signifikante Erhöhung des Signals für die Tiere der IBM-Gruppe in allen Altersstufen, insbesondere im Vergleich zur Kontrollgruppe von B16-Mäusen. Die eindeutige Tendenz dieser Ergebnisse hinsichtlich einer verstärkten Aggregatbildung in den IBM-Tieren ließ sich somit nahtlos mit den Resultaten der Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen in Einklang bringen, welche eine hochsignifikant rascher voranschreitende myopathische Veränderung in den Muskelfasern dieser Tiere zeigte.

Es lässt sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit somit die Vermutung äußern, dass das etablierte doppelt transgene IBM-Mausmodell durchaus zur wissenschaftlichen Arbeit bezüglich der Einschlusskörpermyositis geeignet ist. Es gilt jedoch, sich über die Einschränkungen der Verwendbarkeit dieses Modells im Klaren zu sein. Diese Einschränkungen betreffen in erster Linie die

Methoden zum Nachweis von Entzündungsprozessen und des NO-Stresses. Hinsichtlich des Aufzeigens krankheitsspezifischer Veränderungen im Bereich von Proteinaggregationen und myopathischen Alterationen zeigte sich das Modell weitgehend verlässlich.

Aufgrund der im Zuge dieser Arbeit erhobenen Forschungsergebnisse gilt es weiter zu eruieren, inwieweit das verwendete IBM-Mausmodell auch für Studien anderer Erkrankungen als der Einschlusskörpermyositis einsetzbar wäre. Ein Beispiel soll an dieser Stelle die GNE-Myopathie (frühere Nomenklatur: hereditäre IBM, hIBM) sein. Bei der GNE-Myopathie handelt es sich um eine neuromuskuläre Erkrankung ähnlicher Klinik wie bei der IBM. Die Ätiologie ist jedoch im Falle der GNE-Myopathie eine autosomal rezessiv vererbte und biallele Mutation des GNE-Gens, welches für das Enzym zur Sialinsäuren-Synthese *UPD-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase* kodiert. Im Vordergrund steht auch hier die progressive Muskelschwäche und Atrophie der proximalen sowie distalen Muskulatur der unteren Extremitäten (Yang et al. 1998). Der Beginn der Myopathie liegt in der Regel weitaus früher als bei der IBM und findet sein Maximum bereits im jungen Erwachsenenalter (O’Ferrall und Sinnreich 2013). An Muskelbiopsien humaner Patienten konnten ebenfalls die histologisch typischen *rimmed vacuoles*, jedoch beispielweise deutlich weniger entzündliche Infiltrate als bei der IBM nachgewiesen werden (Behnam et al. 2014). Es existiert auch für die GNE-Myopathie bis zum heutigen Tage keine klinisch etablierte oder standardisierte Therapie. Verschiedene Tiermodelle sind in Studien getestet worden, doch waren sie vielfach mit einem deutlich frühzeitigen Ableben der Tiere, beispielsweise durch rasch progrediente Erkrankungen der Nieren im Sinne eines akuten Nierenversagens, verbunden. Ein verwendetes und zur Erforschung adäquates Modell der GNE-Myopathie, welches der klinischen Erscheinung, Histopathologie und den biochemischen Vorgängen am ehesten entspricht, ist die GNE(-/-) hGNED176V-Tg-Maus (Malicdan et al. 2007). Anhand dieses Modells konnten bisher zufriedenstellende Forschungen zum niedrigprävalenten Krankheitsbild der GNE-Myopathie durchgeführt werden.

Für die Zukunft erscheint es sinnvoll und als möglicher Fokus weiterer Forschungen in Frage kommend, eine Kopplung der IBM mit Modellen der *experimental autoimmune myositis* (EAM) anzustreben. Mittels EAM könnte es gelingen, den Einfluss der Blockaden einzelner Zytokine auf den Krankheitsverlauf nachzuvollziehen. Selbiges ist in der Vergangenheit bereits beispielsweise für die mit der IBM nahe verwandten Polymyositis gelungen (Sugihara et al. 2007). Ebenso könnten künftig weitere klinische Therapieregime durch EAM für die Einschlusskörpermyositis untersucht und hinsichtlich ihrer zu erwartenden Effizienz analysiert werden (Scuderi et al. 2006).

5. Zusammenfassung

Die Einschlusskörpermyositis stellt die häufigste erworbene Myopathie des Patientenkollektivs jenseits des 55. Lebensjahres dar und ist bisher in ihrer multifaktoriellen Pathogenese weitestgehend unverstanden. Konditionen, welche die Progression der Erkrankung beschleunigen oder vermindern, sind ebenfalls bislang wenig bekannt.

Aus vorangegangenen Studien ergab sich ein Anhalt dafür, dass eine Inhibition der iNOS einen protektiven Einfluss auf die Progression der Einschlusskörpermyositis haben könnte.

Mit dieser Arbeit wurde erstmals mittels eines zuvor klinisch charakterisierten Mausmodells die Einflussnahme der iNOS-Defizienz auf die histopathologisch nachweisbaren Veränderungen untersucht.

Unter Verwendung doppelt transgener Mäuse für die humanen Präsenilin- und APP-Gene konnte ein bereits etabliertes Modell herangezogen werden, um beide Gruppen direkt und unter identischen Versuchsbedingungen miteinander zu vergleichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass eine iNOS-Defizienz tatsächlich einen protektiven Effekt auf die Myopathologie der experimentellen Einschlusskörpermyositis besitzt.

Deutlich konnte dieser Effekt anhand des Parameters CNI (in %) sowie anhand der ThioflavinS-Färbung gezeigt werden. In beiden Fällen präsentierten die Gruppen der IBM/iNOS^{-/-} Tiere signifikant weniger myopathische Veränderungen beziehungsweise signifikant weniger Amyloid als die altersgleichen IBM-Tiere. Weiterhin näherten sich die Ergebnisse der IBM/iNOS^{-/-} Tiere sogar deutlich denen der Kontrollgruppe an. Ähnliche Tendenzen zeigten sich auch bei der mRNA-Expression für den Entzündungsmarker β 2M sowie in der Immunhistochemie für MHC I.

Als ausschlaggebender Faktor, welcher die deutlichen Unterschiede zwischen IBM- und IBM/iNOS^{-/-} Tieren erklären könnte, kann die iNOS-Defizienz der letzteren Gruppe angenommen werden, da sich beide Genotypen ansonsten identisch darstellen.

Gesteigerte Entzündungszeichen ließen sich lediglich sehr gering nachweisen, und es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den hier verwendeten Tiergruppen.

In vorherigen Studien an humanen Muskelzellen wurden nach pharmakologisch induzierter Inhibition der iNOS Unterschiede auf histologischer Ebene verminderter NO-Stress und eine Reduktion der Entzündungsaktivität beobachtet. Die Daten unterstützen somit die Hypothese, dass eine reine Akkumulation von β -Amyloid unzureichend ist, um eine vehemente Entzündung zu triggern.

Während durch das IBM-Mausmodell krankheitsspezifische Muster in den Bereichen der Proteinaggregation und myopathischen Alterationen gut nachvollzogen werden können, zeigt es deutliche Defizite beim Aufzeigen entzündlicher und NO-Stress-bedingter Veränderungen.

Aufgrund dieser Eigenschaften gilt es in Zukunft zu prüfen, inwieweit das doppelt transgene IBM-Modell eventuell eher der Untersuchung verwandter Myositiden dienen könnte. Beispielhaft lässt sich an dieser Stelle die seltenere hereditäre Variante der Einschlusskörpermyositis (GNE Myopathy) nennen, welche auch beim Menschen durch geringere histopathologische Anzeichen von NO-Stress und Entzündung gekennzeichnet ist.

6. Literaturverzeichnis

- Arahata K, Engel AG (1984): Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. *Ann Neurol* 16(2), 193–208
- Arnardottir S, Borg K, Ansved T (2004): Sporadic inclusion body myositis: morphology, regeneration, and cytoskeletal structure of muscle fibres. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75(6), 917–920
- Askanas V, Engel WK (1998): Sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies: current concepts of diagnosis and pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 10(6), 530–42
- Askanas V, Engel WK (2001): Inclusion-body myositis: newest concepts of pathogenesis and relation to aging and Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60(1), 1–14
- Askanas V, Engel WK, Nogalska A (2012): Pathogenic considerations in sporadic inclusion-body myositis, a degenerative muscle disease associated with aging and abnormalities of myoproteostasis. *J Neuropathol Exp Neurol* 71(8), 680–93
- Badrising UA, Maat-Schieman M, van Duinen SG, Breedveld F, van Doorn P, van Engelen B, van den, Hoogen F, Hoogendijk J, Höweler C (2000): Epidemiology of inclusion body myositis in the Netherlands: a nationwide study. *Neurology* 55(9), 1385–7
- Bayir H, Kagan VE, Borisenko GG, Tyurina YY, Janesko KL, Vagni VA, Billiar TR, Williams DL, Kochanek PM (2005): Enhanced oxidative stress in iNOS-deficient mice after traumatic brain injury: support for a neuroprotective role of iNOS. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: J Cereb Blood Flow Metab* 25(6), 673–84
- Behnam M, Jin-Hong S, Kim DS, Basiri K, Nilipour Y, Sedghi M (2014): A novel missense mutation in the GNE gene in an Iranian patient with hereditary inclusion body myopathy. *J Res Med Sci* 19(8), 792–794
- Breithaupt M, Schmidt J (2014): Treatment strategies for inclusion body myositis. *Expert Opin Orphan Drugs* 2(12), 1255–1265
- Carstens PO, Schmidt J (2014): Diagnosis, pathogenesis and treatment of myositis: recent advances. *Clin Expert Immunol* 175(4), 349–358
- Chou SM (1967): Myxovirus-like structures in a case of human chronic polymyositis. *Science* 158(3807), 1453–5
- Colton CA, Wilcock DM, Wink DA, Davis J, Van Nostrand WE, Vitek MP (2008): The effects of NOS2 gene deletion on mice expressing mutated human AβetaPP. *J Alzheimers Dis* 15(4), 571–87
- Dalakas MC (2006): Sporadic inclusion body myositis--diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Nat Clin Pract Neurol* 2(8), 437–47
- Guix FX, Urbesalgo I, Coma M, Muñoz FJ (2005): The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 76(2), 126–52
- Karpati G, Pouliot Y, Carpenter S (1988): Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. *Ann Neurol* 23(1), 64–72
- Kitazawa M, Green KN, Caccamo A, LaFerla FM (2006): Genetically augmenting Aβeta42 levels in skeletal muscle exacerbates inclusion body myositis-like pathology and motor deficits in transgenic mice. *AM J Pathol* 168(6), 1986–97
- Kitazawa M, Vasilevko V, Cribbs DH, LaFerla FM (2009): Immunization with amyloid-beta attenuates inclusion body myositis-like myopathology and motor impairment in a transgenic mouse model. *J Neurosci* 29(19), 6132–41

- Kuboyama K, Tsuda M, Tsutsui M, Toyohara Y, Tozaki-Saitoh H, Shimokawa H, Yanagihara N, Inoue K (2011): Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. *Mol Pain* 7(1), 50
- Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I (2007): A Gne knockout mouse expressing human GNE D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 16(22), 2669–82
- O’Ferrall E, Sinnreich M (2013): GNE-Related Myopathy. GeneReviews [internet] 2004 (updated 2013). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1262/> Zugriff 05/2015
- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J (2006): Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26(27), 7212–21
- Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolucci N, Feelisch M, Fukuto J, Wink DA (2004): The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem* 385(1), 1–10
- Rose MR (2013): Inclusion Body Myositis 188th ENMC International Workshop: Inclusion Body Myositis, 2-4 December 2011, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disord* 23(12), 1044–55
- Rygiel KA, Miller J, Grady JP, Rocha MC, Taylor RW, Turnbull DM (2014): Mitochondrial and inflammatory changes in sporadic Inclusion Body Myositis. *Neuropathol Appl Neuro* 41(3), 288-303
- Schmidt J, Rakocevic G, Raju R, Dalakas MC (2004): Upregulated inducible co-stimulator (ICOS) and ICOS-ligand in inclusion body myositis muscle: significance for CD8+ T cell cytotoxicity. *Brain* 127(Pt 5), 1182–90
- Schmidt J, Barthel K, Wrede A, Salajegheh M, Bähr M, Dalakas MC (2008): Interrelation of inflammation and APP in sIBM: IL-1 beta induces accumulation of beta-amyloid in skeletal muscle. *Brain* 131(Pt 5), 1228–40
- Schmidt J, Barthel K, Zschüntzsch J, Muth IE, Swindle EJ, Hombach A, Sehmisch S, Wrede A, Lühder F, Gold R (2012): Nitric oxide stress in sporadic inclusion body myositis muscle fibres: inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents interleukin-1 β -induced accumulation of β -amyloid and cell death. *Brain* 135(Pt 4), 1102–14
- Scuderi F, Mannella F, Marino M, Provenzano C, Bartoccioni E (2006): IL-6-deficient mice show impaired inflammatory response in a model of myosin-induced experimental myositis. *J Neuroimmunol* 176(1-2), 9–15
- Sugihara T, Sekine C, Nakae T, Kohyama K, Harigai M, Iwakura Y, Matsumoto Y, Miyasaka N, Kohsaka H (2007): A new murine model to define the critical pathologic and therapeutic mediators of polymyositis. *Arthritis Rheum* 56(4), 1304–14
- Van der Meulen MF, Hoogendijk JE, Jansen GH, Veldman H, Wokke JH (1998): Absence of characteristic features in two patients with inclusion body myositis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64(3), 396–8
- Venalis P, Lundberg IE (2014): Immune mechanisms in polymyositis and dermatomyositis and potential targets for therapy. *Rheumatology (Oxford)* 53(3), 397–405
- Voigt E, Schmidt J, Weller C (2011): Laufradtestung im doppelt transgenen APP/PS1-Mausmodell der Einschlusskörpermyositis. *DGN 2011* 49(0), 9394
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002): Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416(6880), 535–9

Yang CC, Alvarez RB, Engel WK, Heller SL, Askanas V (1998): Nitric oxide-induced oxidative stress in autosomal recessive and dominant inclusion-body myopathies. *Brain* 121(2), 1089–97

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

Zheng H, Koo EH (2006): The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 12, 1–12

Danksagung

Zunächst möchte ich in besonderem Maße Herrn Prof. Dr. med. J. Schmidt für die Entwicklung der Projektidee und die stets verlässliche Unterstützung bei der Bearbeitung danken. Ständige Ansprechbarkeit, kompetente Hilfe und eine druckfreie Atmosphäre bescherten mir beste Arbeitsbedingungen.

Herzlicher Dank gebührt außerdem Frau Elisabeth Voigt für ihre zuvor durchgeführten Experimente, die einen wesentlichen Anstoß zur Planung meines Projekts gaben.

Einen weiteren ganz besonderen Dank möchte ich Frau Dr. Jana Zschüntzsch widmen, die mir im Verlaufe der Jahre immer als Ansprechpartnerin in fachlichen, technischen und vielen weiteren Angelegenheiten mit beispiellosem Engagement zur Verfügung gestanden hat.

Dank möchte ich auch den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau Marit Hubrecht, Frau Iris Iben und Frau Fatima Agdas sagen. Ohne ihre immerwährende technische Unterstützung und Hilfe bei Methodik und Verwendung der wissenschaftlichen Gerätschaften wäre eine erfolgreiche Durchführung meines Projektes nicht realisierbar gewesen.

Lebenslauf

Ich, Thorben Ingo Alexy, wurde am 18.12.1987 als Sohn von Dr. med. Hans-Jürgen Alexy und Ulrike Alexy (geb. Vogl) in Hannover geboren. Meine beiden Geschwister sind Silke Stefanie Rieckmann (38, geb. Alexy) und Dr. med. Helge Hans Alexy (34).

Meine schulische Ausbildung begann im Jahre 1993 an der Grundschule Wennigsen, gefolgt von der Orientierungsstufe an der Sophie-Scholl-Gesamtschule Wennigsen und endete 2007 mit meinem Abitur und der Durchschnittsnote 1,4 am Matthias-Claudius-Gymnasium in Gehrden.

Nach Ableistung meines Wehrdienstes von 9 Monaten (Panzertruppenschule Munster), einem Auslandsaufenthalt in Australien und Verrichtung meines Krankenpflegepraktikums im Robert-Koch-Krankenhaus Gehrden nahm ich zum Sommersemester 2009 mein Medizinstudium an der Georgia Augusta in Göttingen auf. Mein Physikum erwarb ich im Frühjahr 2011 mit der Note 1 sowie den schriftlichen Teil des zweiten Staatsexamens im April 2014. Es folgte im Frühjahr 2015 der Abschluss meines Medizinstudiums in Regelstudienzeit durch Ablegen des mündlichen Staatsexamens mit der Note 1.

Im September 2011 begann ich in der Arbeitsgruppe für Muskelimmunologie bei Prof. Dr. med. J. Schmidt meine Doktorarbeit in der Klinik für Neurologie, unter der Leitung von Prof. Dr. med. M. Bähr.

Seit Juli 2009 bin ich als Sanitätsoffizieranwärter (SanOA) bei der Bundeswehr in der entsprechenden Laufbahn in den Dienst eingetreten und habe seit Mai 2015 meine Erstverwendung als Stabsarzt in der Abteilung für Innere Medizin im Bundeswehrkrankenhaus Westerstede angetreten.