

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

Histopathologische Charakterisierung von Muskelzellstress bei der Einschlusskörpermyositis

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Rosa Götze-Brown, geb. Götze

aus

Berlin

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. med. J. Schmidt

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. med. J. Schmidt

Ko-Referent: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Drittreferent: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 17.11.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Histopathologische Charakterisierung von Muskelzellstress bei der Einschlusskörpermyositis" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Die Einschlusskörpermyositis.....	1
1.2 Histopathologie der IBM.....	5
1.2.1 Morphologie.....	5
1.2.2 <i>red-rimmed vacuoles</i>	6
1.2.3 MHC I und CD8 ⁺	6
1.2.4 COX.....	7
1.2.5 C5b-9.....	8
1.2.6 Protein p62.....	8
1.2.7 α -Synuklein	9
1.2.8 TOM20	9
1.2.9 iNOS	10
1.2.10 β -Amyloid	11
1.2.11 α BCrystallin	13
1.3 Ziele der Arbeit	13
2 Material und Methoden	16
2.1 Fallstudie.....	20
2.1.1 Krankheitsverlauf.....	20
2.1.2 Material und Färbungen.....	21
2.1.3 Histopathologische Auswertung.....	21
2.1.4 Klinisch-neurologischer Untersuchungsbefund.....	23
2.1.5 Statistik.....	26
2.2 Laser-Mikrodissektion.....	26
2.2.1 Ablauf.....	26
2.2.2 Gewebeproben und Färbungen.....	27
2.2.3 Laser-Mikrodissektion.....	28
2.2.4 RNA-Extraktion.....	30
2.2.5 Versuchsablauf mit frischem Muskelgewebe.....	30
2.3 Einzelfaser-Analyse.....	31
2.3.1 Patientenkollektiv, Geräte und Übersicht der Färbungen	31
2.3.2 H.E.-Färbung.....	31
2.3.3 Trichrom-Gomori-Färbung.....	32
2.3.4 COX/SDH-Färbung.....	32
2.3.5 Immunhistochemie.....	33

2.3.6	TOM20/MHC I.....	34
2.3.7	p62/ α BCrystallin	34
2.3.8	iNOS/ β -Amyloid.....	34
2.3.9	Auswertung.....	35
2.3.10	Statistik.....	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Fallstudie.....	39
3.1.1	Färbungen	39
3.1.2	Klinisch betroffene Muskeln.....	40
3.1.3	Quantitative Auswertung.....	41
3.1.4	Auswertung des Faserdurchmessers	44
3.1.5	Atrophie und abnehmende Muskelkraft.....	48
3.1.6	Hypertrophie und p62.....	50
3.1.7	CD8 ⁺ und p62	50
3.1.8	p62 und α BCrystallin	50
3.1.9	α BCrystallin und <i>red-rimmed vacuoles</i>	51
3.1.10	α BCrystallin und MHC I.....	51
3.2	Laser-Mikrodissektion.....	51
3.2.1	Schnittdicke.....	52
3.2.2	Färbungen	52
3.2.3	Fluoreszenz-Färbungen.....	54
3.2.4	Durchlicht-Färbungen.....	54
3.2.5	Fixierung nach der Färbung.....	54
3.2.6	Isolation der Zielzellen mittels Laser-Mikrodissektion	55
3.2.7	Fixierung der ausgeschnittenen Muskelfasern.....	58
3.2.8	RNA-Isolation	59
3.2.9	Vergleich zu frischen Biopsien von gesunden Patienten.....	59
3.2.10	Zusammenfassung.....	61
3.3	Einzelfaser-Analyse.....	62
3.3.1	Quantitative Analyse des Muskelschnitts	62
3.3.2	Analyse des longitudinalen Verlaufs	65
3.3.3	Quantitative Analyse der Einzelfasern.....	69
3.3.4	Morphologie der α BCrystallin-positiven Einzelfasern	74
3.3.5	Lokalisation des TOM20 Fluoreszenzsignals in α BCrystallin-positiven Einzelfasern	74
3.3.6	Multiparameteranalyse der α BCrystallin-positiven Einzelfasern.....	75
3.3.7	Multiparameteranalyse der α BCrystallin-negativen Einzelfasern.....	78
3.3.8	Zweistufige Multiparameteranalyse der α BCrystallin-positiven und α BCrystallin-negativen Einzelfasern	81
4	Diskussion	85
4.1	Fallstudie und Einzelfaseranalyse	85
4.1.1	Besondere Bedeutung der Fallstudie und Einzelfaseranalyse	85
4.1.2	Atrophie und Muskelkraft	86
4.1.3	Hypertrophie und p62.....	86

4.1.4	α BCrystallin-Positivität und -Negativität in der Einzelfaseranalyse	87
4.1.5	p62, 6E10 und α BCrystallin.....	88
4.1.6	COX-Defizienz, TOM20 und α BCrystallin	89
4.1.7	MHC I, iNOS und α BCrystallin.....	92
4.1.8	Fazit der Fallstudie und Einzelfaseranalyse	93
4.2	Laser-Mikrodissektion.....	94
4.2.1	UV-Laser als Schneidesystem	95
4.2.2	α BCrystallin als Zielstruktur	95
4.2.3	Einflussfaktor IBM.....	98
5	Zusammenfassung.....	100
6	Literaturverzeichnis	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ermittlung des Muskelfaserdurchmessers.....	22
Abbildung 2: Ablauf der Laser-Mikrodissektion.....	29
Abbildung 3: Färbungen der Fallstudie in 20-facher Vergrößerung.....	39
Abbildung 4: Prozentualer Anteil der positiven bzw. COX-defizienten Muskelfasern in den Ausschnitten der verschiedenen Muskelproben.....	42
Abbildung 5: Korrelation zwischen den prozentualen Werten für α BCrystallin- und MHC I-positiven Muskelfasern.....	44
Abbildung 6: Muskelfaserdurchmesser als Streudiagramm dargestellt.....	45
Abbildung 7: Variabilitätskoeffizienten der Muskelfaserdurchmesser in den entnommenen Muskelproben.....	46
Abbildung 8: Atrophie- und Hypertrophiefaktor der entnommenen Muskelproben.....	47
Abbildung 9: Beispiele der Laser-Mikrodissektion an IBM-Biopsien.....	58
Abbildung 10: Überblick über die verschiedenen LMD-Versuche.....	61
Abbildung 11: Prozentualer Anteil der positiven Muskelfasern der jeweiligen Färbung an der Gesamtzahl der Muskelfasern im Schnitt.....	63
Abbildung 12: Biopsie 1.....	65
Abbildung 13: Biopsie 2.....	66
Abbildung 14: Biopsie 3.....	67
Abbildung 15: Biopsie 4.....	68
Abbildung 16: Färbekontrollen.....	69
Abbildung 17: Prozentualer Vergleich der positiven Marker, Atrophie und Hypertrophie bei n = 100 α BCrystallin-positiven und n = 100 α BCrystallin-negativen Einzelfasern.....	70
Abbildung 18: Prozentuale Verteilung der Lokalisation des TOM20-Fluoreszenzsignals in den n = 100 α BCrystallin-positiven Einzelfasern.....	75
Abbildung 19: Flussdiagramm der α BCrystallin-positiven Einzelfasern.....	77
Abbildung 20: Flussdiagramm der α BCrystallin-negativen Einzelfasern.....	80
Abbildung 21: Zweistufige prozentuale Auswertung der n = 100 α BCrystallin-positiven Einzelfasern.....	82
Abbildung 22: Zweistufige prozentuale Auswertung der n = 100 α BCrystallin-negativen Einzelfasern.....	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: European Neuromuscular Center (ENMC)-Kriterien " <i>probable IBM</i> " (Rose und ENMC IBM Working Group 2013).....	3
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien mit Angabe des Herstellers und ggf. einer näheren Produktbezeichnung.....	16
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien mit Angabe des jeweiligen Herstellers.....	17
Tabelle 4: Antikörper für die Fluoreszenzfärbungen. Angegeben sind die Bezeichnung, der Hersteller und die Artikelnummer.....	19
Tabelle 5: Patientenproben für die verschiedenen Versuche. Angegeben sind die Erkrankung, der jeweilige Name der Patientenprobe und die Verwendung.....	19
Tabelle 6: Muskelfaserdurchmesser in μm als Grenzwerte für die Berechnung des Atrophie- und Hypertrophiefaktors bei Frauen.....	22
Tabelle 7: Medical Research Council(MRC)-Kraftgrade.....	23
Tabelle 8: Die Tätigkeiten der zehn Kategorien der <i>inclusion body myositis functional rating scale</i>	24
Tabelle 9: Klinisch-neurologischer Untersuchungsbefund des letzten Ambulanzbriefes vor dem Tod des Patienten.....	25
Tabelle 10: Zielstrukturen für die LMD mit den Kriterien $\alpha\text{BCrystallin}$ -Anfärbbarkeit und Morphologie der Muskelfaser.....	26
Tabelle 11: Grenzwerte der RNA-Quantität und -Qualität für die miRNA-Sequenzierung.....	30
Tabelle 12: Geschlechtsspezifische Grenzwerte für Normotrophie, Atrophie und Hypertrophie von Muskelfaserquerschnitten.....	37
Tabelle 13: Entnommene Muskeln und klinische Affektion.....	40
Tabelle 14: Muskelproben, klinische Affektion und Atrophiefaktor (auf eine Dezimalstelle gerundet).....	49
Tabelle 15: Verschiedene LMD-Versuche mit Myositis-Biopsien und die jeweilige RNA-Ausbeute.....	53
Tabelle 16: Verschiedene LMD-Versuche an frischem Muskelgewebe und die jeweilige RNA-Ausbeute.....	60
Tabelle 17: Vergleich der Versuche mit IBM-Biopsien und frischem Muskelgewebe aus elektiven Knie-Operationen.....	60
Tabelle 18: Ergebnisse der Einzelfaser-Korrelationsanalyse des $\alpha\text{BCrystallin}$ -Färbeverhalten.....	71
Tabelle 19: Ergebnisse der Einzelfaser-Korrelationsanalyse der Färbungen gegeneinander.....	72
Tabelle 20: Anzahl bzw. entsprechender Prozentwert des Färbemusters ausgehend von $\alpha\text{BCrystallin}$ -positiven Einzelfasern.....	76
Tabelle 21: Anzahl bzw. entsprechender Prozentwert des Färbemusters ausgehend von $\alpha\text{BCrystallin}$ -negativen Einzelfasern.....	79

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
Aqua bidest.	<i>aqua bidestillata</i>
Aqua dest.	<i>aqua destillata</i>
A β	β -Amyloid, auch: Amyloid- β
A β 40	Amyloid- β 40
A β 42	Amyloid- β 42
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CD8 ⁺	<i>cluster of differentiation 8⁺</i>
CK	Creatinkinase, auch: Kreatinkinase
COX	Cytochrom-c-Oxidase
Cy3	<i>Cyanine 3</i>
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DM	Dermatomyositis
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ENMC	European Neuromuscular Center
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSP	<i>heat shock protein</i>
IBM	<i>inclusion body myositis</i>
IBMFRS	<i>inclusion body myositis functional rating scale</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN- γ	Interferon- γ
IIM	idiopathische inflammatorische Myopathie
IL-1 β	Interleukin-1 β
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i> , induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IVIG	intravenöse Immunglobuline
KG	Kraftgrad
kPa	Kilopascal
LMD	Laser-Mikrodissektion
M.	<i>Musculus</i>
MAK	Membranangriffskomplex

MER	Muskeigenreflex
MHC I	<i>major histocompatibility complex I</i>
miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>
MM	Myofibrilläre Myopathie
MMI	Molecular Machines & Industries
MRC	Medical Research Council
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
mtDNA	<i>mitochondrial deoxyribonucleic acid</i>
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NGS	<i>normal goat serum</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NM	Nekrotisierende Myopathie
NO	<i>nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
p-tau	phosphoryliertes Tau
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PM	Polymyositis
RIN	<i>ribonucleic acid integrity number</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SDH	Succinat-Dehydrogenase
sIBM	<i>sporadic inclusion body myositis</i>
sIFA	<i>sporadic inclusion body myositis physical functioning assessment</i>
TIM	<i>translocase of the inner membrane</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i>
UMG	Universitätsmedizin Göttingen

1 Einleitung

1.1 Die Einschlusskörpermyositis

Die Einschlusskörpermyositis (engl. *inclusion body myositis*, IBM) ist die häufigste idiopathische inflammatorische Myopathie (IIM) bei über 50-Jährigen (Dimachkie und Barohn 2014).

Der Erstbeschreiber Shi-ming Chou (1967) berichtete 1967 in einer Fallstudie über einen Polymyositis-Patienten, der in drei Biopsien IBM-ähnliche histopathologische Merkmale und IBM-charakteristische Symptome zeigte. Die Bezeichnung *inclusion body myositis* stammt aus dem Jahr 1971 und wurde erstmals ebenfalls im Zusammenhang mit einer Fallstudie verwendet, bei der anhand der Biopsie zunächst eine Polymyositis (PM) vermutet wurde (Yunis und Samaha 1971).

Es gibt sowohl eine sporadische (sIBM) als auch eine nicht-entzündliche hereditäre (hIBM) Form, wobei in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die sporadische Variante untersucht wird.

Da die Prävalenz der IBM von der geografischen bzw. ethnischen Herkunft und dem Alter abhängt, variieren die Angaben zwischen 4,9 bis 33 pro 1.000.000 Einwohner bzw. 51,3 pro 1.000.000 Einwohner bei den über 50-Jährigen (Schmidt und Schmidt 2017). Das Verhältnis von betroffenen Männern zu Frauen beträgt etwa 3:2 und das mittlere Alter bei der Diagnosestellung beträgt 70 Jahre (Deenen et al. 2016). Hierbei ist zu beachten, dass aufgrund des langsam-schleichenden Prozesses und der teils unspezifischen Symptome zu Krankheitsbeginn bis zur Stellung der Diagnose im Durchschnitt mehr als fünf Jahre vergehen können (Needham et al. 2008b; Molberg und Dobloug 2016).

Charakteristisch für die IBM sind eine Muskelatrophie und eine daraus resultierende ubiquitäre Muskelschwäche mit Betonung des Musculus (M.) quadriceps femoris und der tiefen Fingerflexoren, wobei typischerweise ein asymmetrisches Verteilungsmuster vorliegt. Bei 65 % der Patienten besteht eine symptomatische Dysphagie, bei 79 % ist videofluoroskopisch (Cox et al. 2009) bzw. bei 80 % in Real-Time-Magnetresonanztomografie (MRT) (Olt-hoff et al. 2016) eine Einschränkung beim Schlucken nachweisbar. Da Schluckbeschwerden beispielsweise zu Kachexie und Pneumonie führen können, gelten sie als relevanter Risikofaktor eines schweren Krankheitsverlaufes (Price et al. 2016). Ein weiteres häufiges Symptom der IBM ist eine leichte Schwäche der Gesichtsmuskulatur (Dimachkie und Barohn 2013).

Der Krankheitsverlauf ist typischerweise langsam chronisch-progredient über viele Jahre (Benveniste et al. 2011) hinweg und führt zu einer immer größer werdenden Einschränkung der Alltagsaktivitäten. Durch die Schwäche in den Handmuskeln fallen den Patienten das Schreiben, Essen, Ankleiden etc. schwer und sie sind zunehmend auf Hilfe angewiesen. Auch

das Gehen wird für die Patienten zu einer Herausforderung, sodass sie im langfristigen Krankheitsverlauf Gehhilfen oder einen Rollstuhl nutzen müssen (Cox et al. 2011a). Durch die Schwäche im M. quadriceps femoris und entsprechender unzureichender Stabilisierung des Knies kommt es bei IBM-Patienten gehäuft zu Stürzen, die oft der initiale Anlass für eine Vorstellung beim Arzt sind und im Verlauf bei fast allen Patienten auftreten (Needham et al. 2008a). Die Verschlechterung der Mobilität und des Gehvermögens sowie die seelische Belastung beeinträchtigen den Alltag der Patienten (Gibson et al. 2016).

Auch wenn die Lebenserwartung bei IBM nicht verkürzt ist, so ist durch die Symptome die Lebensqualität der Patienten stark eingeschränkt (Cox et al. 2011a).

Für die IBM-Diagnostik werden neben einer ausführlichen Anamnese und klinisch-neurologischen Untersuchung auch eine Muskelbiopsie, Laboruntersuchungen und ggf. elektrophysiologische Untersuchungen und Bildgebung eingesetzt.

Die sog. Griggs-Kriterien aus dem Jahr 1995 wurden lange als Leitfaden für die IBM-Diagnostik benutzt (Griggs et al. 1995). Da aber die histopathologischen Merkmale im Vergleich zu den klinischen Symptomen zu stark ins Gewicht fallen, wurde bei Anwendung der Griggs-Kriterien festgestellt, dass es zu einer Unterdiagnose der IBM zuungunsten der PM kam: Bei vielen Patienten zeigten sich zwar klinische Symptome der IBM, aber histopathologisch wurden die Griggs-Kriterien für die Diagnose der IBM nicht genügend erfüllt. Diese Patienten wurden somit oft fälschlicherweise nicht als IBM erkannt, sondern erhielten stattdessen beispielsweise die Diagnose PM (Chahin und Engel 2008) oder Motoneuronenerkrankung (Badrising et al. 2000).

Während des 188. European Neuromuscular Center(ENMC)-Workshops wurden 2011 von der ENMC IBM Working Group die „ENMC IBM Research Diagnostic Criteria“ (auch: ENMC-Kriterien) erstellt (Rose und ENMC IBM Working Group 2013) und 2013 veröffentlicht. Sie beinhalten eine stärkere Berücksichtigung des klinischen Phänotyps. Anhand der Kriterien „Dauer der Symptome“, „Alter“, „Verteilung der Muskelschwäche“, „Höhe der Kreatinkinase (auch: Creatinkinase, CK)“ und pathologischer Merkmale wie dem Vorhandensein von *rimmed vacuoles* ist eine Einordnung in „*clinico-pathologically defined IBM*“, „*clinically defined IBM*“ und „*probable IBM*“ möglich. Im Vergleich mit verschiedenen Klassifikationssystemen haben die „ENMC *probable IBM*“-Kriterien die höchste Sensitivität und Spezifität (Lloyd et al. 2014) und sind daher am besten für die Stellung der Diagnose geeignet, siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: European Neuromuscular Center (ENMC)-Kriterien "probable IBM" (Rose und ENMC IBM Working Group 2013).

Klinische und laborchemische Merkmale	Pathologische Merkmale (eins oder mehrere der folgenden, aber nicht alle)
Erkrankungsdauer > 12 Monate	Endomysiales inflammatorisches Infiltrat
Alter bei Symptombeginn > 45 Jahre	Hochregulation von MHC I auf Muskelzellen
Schwäche der Knieextension \geq Hüftflexion oder Schwäche der Fingerflexion > Schulterabduktion	Vorhandensein von <i>rimmed vacuoles</i>
Serum-CK nicht höher als 15-fach über dem oberen Normwert	Proteinakkumulation* oder 15-18 nm Filamente

* = Nachweis von Amyloid oder anderer Proteinakkumulation mit etablierten Methoden, z. B. Congo Rot, Kristallviolett, Thioflavin T/S, p62, SMI-31, TDP-43.

Neben der IBM zählen die Dermatomyositis (DM), Polymyositis (PM) und Nekrotisierende Myopathie (NM) zu den Vertretern der Krankheitsgruppe der IIM (Carstens und Schmidt 2014). In der IBM laufen im Gegensatz zu den anderen IIM-Formen nicht nur entzündliche, sondern auch degenerative Prozesse ab. Histopathologisch ähnelt das Entzündungsmuster dem der PM (Schmidt und Dalakas 2010), allerdings sind bei der IBM Zeichen von Degeneration wie beispielsweise *red-rimmed vacuoles* und β -Amyloid (s. u.) nachweisbar. Im Gegensatz zu den anderen IIM ist bei IBM sowohl die proximale als auch die distale Muskulatur betroffen (Malik et al. 2016) und die CK-Erhöhung milder (normal bzw. bis zu 15-fach erhöht) (Schmidt 2018).

Ein weiteres relevantes Unterscheidungsmerkmal zu den anderen Myositis-Formen ist das bei IBM schlechte bzw. fehlende Ansprechen auf eine immunsuppressive Therapie (Malik et al. 2016). Die sonst bei Myositis gängigen Therapieversuche mit Glukokortikosteroiden, Azathioprin, Methotrexat usw. sind in der Regel erfolglos (Schmidt und Schmidt 2017). Der Einsatz von intravenösen Immunglobulinen (IVIG) bei IBM-Patienten wurde in verschiedenen Studien untersucht. Die Ergebnisse reichten von einer Besserung der Dysphagie (Cherin et al. 2002) unter IVIG bis zu einer leichten Abschwächung klinischer Symptome (Walter et al. 2000), aber ein klarer Therapieerfolg blieb aus. Eine Cochrane-Analyse kam zu dem Fazit, dass für eine Aussage über IVIG bei IBM mehr klinische Studien mit größerem Patientenkollektiv und längerer Laufzeit notwendig sind (Rose et al. 2015). Da in Studien bei einigen Patienten eine leichte Verbesserung der Dysphagie und Kraftgrade festgestellt wurde, scheint ein Therapieversuch mit IVIG für sechs Monate mit einer Dosis von 1-2 g/kg Körpergewicht aller sechs bis acht Wochen gerechtfertigt zu sein (Fitzner und Schmidt 2016).

Aufgrund der unzureichenden medikamentösen Möglichkeiten haben nicht-medikamentöse Therapien bei der IBM einen sehr relevanten Stellenwert. So werden Physiotherapie bzw. Bewegung empfohlen (Alexanderson 2016) und bei Schluckstörungen eine logopädische Behandlung in Betracht gezogen (Fitzner und Schmidt 2016). Unter Umständen ist bei Enge am M. cricopharyngeus eine lokale Botulinumtoxintherapie, Dilatation, perkutane endoskopische Gastrostomie (PEG) oder sogar eine Myotomie indiziert (Carstens und Schmidt 2014).

Die Ätiologie der IBM ist bisher weitestgehend ungeklärt (Fitzner und Schmidt 2016). Es wird vermutet, dass durch chronische Inflammation eine zunehmende Degeneration des Skelettmuskels verursacht wird. Histopathologische Zeichen der Inflammation sind beispielsweise eine *cluster of differentiation 8⁺(CD8⁺)-Zell-Invasion* und eine Hochregulation des *major histocompatibility complex* der Klasse I (MHC I) auf den Muskelfasern; Protein-Akkumulation und Vakuolisierung sind hingegen Hinweise für Myodegeneration bei IBM (Schmidt und Schmidt 2017). Diese charakteristischen Merkmale werden auch bei den ENMC-Kriterien (s. o.) zur Diagnosestellung der IBM hinzugezogen. Des Weiteren sind Zellstressmarker wie α BCrystallin nachweisbar und stehen vermutlich mit der Protein-Akkumulation in Zusammenhang (Muth et al. 2009). Die genauen Prozesse und zeitlichen Abläufe in der Pathogenese der IBM konnten bisher nicht abschließend geklärt werden. Weiteres zu den histopathologischen Markern und ihrer Bedeutung für die Pathogenese der IBM siehe Kapitel 1.2.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei der IBM um die häufigste idiopathische inflammatorische Myopathie des höheren Alters handelt. Sie manifestiert sich charakteristischerweise an M. quadriceps femoris und den tiefen Fingerflexoren mit Muskelatrophie und -schwäche, die zu Beginn oft ein asymmetrisches Verteilungsmuster zeigen. Die Stellung der Diagnose ist durch den langsam chronisch-progressiven Verlauf oft verzögert. In Muskelbiopsien von IBM-Patienten sind Zeichen von Inflammation, Myodegeneration und Zellstress nachweisbar, wobei das Zusammenspiel dieser Prozesse und die genaue Pathogenese bisher ungeklärt sind. Da das Gehen und die Bewältigung der Alltagsaktivitäten für die Patienten mit der Zeit immer schwerer werden, sind sie zunehmend auf fremde Hilfe und Hilfsmittel angewiesen. Die IBM gilt zwar nicht als lebensverkürzende Krankheit, geht aber mit einem Verlust an Lebensqualität einher. Zudem liegt bei einem Großteil der Patienten eine Dysphagie vor, was mit einem schwereren Verlauf und Komplikationen wie einem erhöhten Risiko für Pneumonie verbunden ist. Derzeit gibt es weder eine kurative Therapie, noch spricht die IBM wie andere IIM gut auf Immunsuppression an, sodass den Patienten individuelle Therapieversuche und nicht-medikamentöse Ansätze angeboten werden.

1.2 Histopathologie der IBM

In Muskelbiopsien von IBM-Patienten lassen sich verschiedene morphologische Auffälligkeiten finden und spezifische Strukturen immunhistochemisch anfärben. Die Biopsie ist einerseits ein wichtiger Baustein in der Diagnostik der IIM und zur Abgrenzung der IBM zu anderen IIM-Subtypen, die differenzialdiagnostisch in Erwägung gezogen werden könnten (Oldroyd et al. 2017). Andererseits kann mithilfe der Muskelbiopsie von IBM-Patienten die Pathogenese der Krankheit wissenschaftlich untersucht werden. Bei der IBM gibt es verschiedene Prozesse der Inflammation und Degeneration, die an der Morphologie der Muskelfasern und ihrer immunhistochemischen Anfärbbarkeit erkannt werden können. Aus diesen histopathologischen Charakteristika lassen sich Hypothesen über die Pathogenese der IBM aufstellen.

Da in der vorliegenden Arbeit verschiedene Untersuchungen an Muskelbiopsien von IBM-Patienten durchgeführt und ausgewertet wurden, findet sich im Folgenden eine Darstellung der verschiedenen morphologischen und histologischen bzw. immunhistochemischen Marker und Charakteristika, die für die vorliegende Arbeit relevant sind.

Nicht immer liegen in einer IBM-Muskelbiopsie alle histopathologischen Merkmale der IBM vor und bei einigen Patienten ist trotz der klinischen IBM-Diagnose die Biopsie ohne Befund (Keller et al. 2017). In dieser Arbeit werden nur Biopsien von neuropathologisch (Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen, kurz UMG) bestätigten IBM-Biopsien verwendet.

1.2.1 Morphologie

Im Zuge der Inflammation kommt es bei einer Myositis erst zu ödematösen Veränderungen, auf die fettige Umbauprozesse oder eine Atrophie der Muskelfasern folgen können (Carstens und Schmidt 2014). Auch wenn diese Veränderungen nicht spezifisch für IIM und somit auch nicht für die IBM sind, so kann an einer Atrophie und Fettinfiltration langfristig geschädigtes Muskelgewebe erkannt werden.

Bei der IBM sind anguläre atrophe Muskelfasern nachweisbar, bei denen vermutet wird, dass es sich um kürzlich denervierte Fasern handelt, verursacht vor allem durch myogene Denervierung. Zudem gibt es einen kleineren Anteil nicht-angulärer atropher Fasern (Engel und Askanas 2006). Bei der IBM liegen die atrophen Fasern in kleinen Gruppen zusammen (Dimachkie und Barohn 2014). Die Muskelfasern zeigen eine nennenswerte Variation (Arnardottir et al. 2004) im Faserkaliber, d. h. atrophe, hypertrophe und normokalibrige Muskelfasern sind zeitgleich vorhanden. Des Weiteren sind in IBM-Biopsien nekrotische Fasern, regenerierende Muskelfasern und ein erhöhter Anteil von Fett und Bindegewebe sichtbar (Arnardottir et al. 2004), wobei das Bindegewebe vor allem im Endo- und Perimysium zunimmt (de Camargo et al. 2018). Die Atrophie und Fettinfiltration der Skelettmuskeln sind im Verlauf auch im MRT sichtbar (Cox et al. 2011b) und sind Zeichen einer chronischen

Schädigung der Muskulatur (Dimachkie und Barohn 2014). Die o. g. morphologischen Auffälligkeiten in IBM-Biopsien, d. h. Atrophie und Hypertrophie bzw. Faserkaliber-Variation und Fett- und Bindegewebeinfiltration sind Anzeichen für stattfindende Umbauprozesse im Sinne einer Regeneration und Degeneration.

1.2.2 *red-rimmed vacuoles*

Bei den für IBM charakteristischen *red-rimmed vacuoles* (auch: *rimmed vacuoles*) handelt es sich um rot umrandete, intrazytoplasmatische Vakuolen, gut sichtbar in der Hämatoxylin-Eosin(H.E.)-Färbung (Güttsches et al. 2017) oder Gomori-Trichrom-Färbung (Dimachkie und Barohn 2014). Die Vakuolen enthalten unter anderem β -Amyloid (Villanova et al. 1993) und sind somit ein Zeichen für Proteinakkumulation und Degeneration bei IBM. Abgesehen von den rot umrandeten lysosomalen Vakuolen gibt es oft auch Vakuolen ohne roten Rand (Engel und Askanas 2006). Zwar sind die *red-rimmed vacuoles* nicht spezifisch für IBM, sondern können auch bei anderen Myopathien gefunden werden (Hilton-Jones und Brady 2016), aber ihr Auftreten ist so typisch, dass sie ein Kriterium der ENMC-Kriterien sind. Da ein Fehlen von *red-rimmed vacuoles* vorrangig in den Biopsien jüngerer Patienten zu beobachten ist, wird vermutet, dass sie eher in einem späten Krankheitsstadium auftreten (Brady et al. 2013).

1.2.3 MHC I und CD8⁺

Der *major histocompatibility complex* der Klasse I (MHC I) findet sich auf der Oberfläche kernhaltiger Zellen einschließlich Thrombozyten. Er spielt eine zentrale Rolle in der Funktion des Immunsystems, indem er einerseits zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen Antigene präsentiert und andererseits gesunde Zellen vor einer Abtötung durch NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) schützt. MHC I ist in Muskelbiopsien von IBM-Patienten typischerweise vermehrt exprimiert, was einen inflammatorischen Prozess anzeigt (van der Pas et al. 2004; Dimachkie und Barohn 2014). Auch in den ENMC-Kriterien ist eine MHC I-Hochregulation als Zeichen einer Inflammation bei den Kategorien „*clinically defined IBM*“ und „*probable IBM*“ als Kriterium berücksichtigt. Es konnte gezeigt werden, dass es in regenerierenden Fasern verschiedener Muskelerkrankungen (IBM, DM, PM und weitere) zur Expression von MHC I auf der Muskelfaseroberfläche kommt (Karpati et al. 1988). Die MHC I-Positivität ist bei IBM stärker als bei DM oder PM ausgeprägt (van der Pas et al. 2004).

Zytotoxische T-Lymphozyten haben das Protein CD8 in ihre Zellmembran eingelagert und werden somit auch als CD8⁺-T-Lymphozyten (auch: CD8⁺-Zellen) bezeichnet. Auch auf anderen Zellen, beispielsweise NK-Zellen kommt CD8 vor, aber die zytotoxischen T-Zellen stellen den Großteil der CD8⁺-Zellpopulation und sind somit die relevantesten Vertreter. CD8 ist als Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors an der Bindung des MHC I-Komplexes beteiligt.

Das Zusammenspiel von CD8⁺ und MHC I ist in IBM-Patientenbiopsien erkennbar, da CD8⁺-Zellen in betroffenem Muskelgewebe MHC I-exprimierende, nicht-nekrotische Muskelfasern umgeben bzw. in diese eindringen (Arahata und Engel 1986). Diese Verbindung zwischen der MHC I-tragenden Muskelfaser und den autoinvasiven CD8⁺-T-Zellen kann auch als immunologische Synapse bezeichnet werden (Dalakas 2006). Die CD8⁺-Zellen können eine Nekrose der Muskelfasern bewirken; so konnte beispielsweise in 71 % der ICOS(*inducible co-stimulator*)-positiven CD8⁺-Zellen Perforin nachgewiesen werden (Schmidt et al. 2004).

1.2.4 COX

Das Enzym Cytochrom-c-Oxidase (kurz: COX) ist an der Reaktion von Sauerstoff zu Wasser als Komplex IV in der Atmungskette beteiligt und ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Die COX katalysiert als gekoppelte Reaktion einerseits die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser mithilfe von Elektronen vom Cytochrom c und andererseits den Transport von Protonen über die innere Mitochondrienmembran. Die COX ist somit ein wichtiger Bestandteil des Energiestoffwechsels. Die Untereinheit I, auch COX-I genannt, ist eine von 13 Untereinheiten. Die drei relevantesten Untereinheiten COX-I, -II und -III werden mitochondrial codiert und ermöglichen die Katalyse. Die anderen zehn Untereinheiten werden als Vorläufer-Proteine an Ribosomen des Zytoplasmas translatiert und dann von den Transportproteinen TIM (*translocase of the inner membrane*) und TOM (*translocase of the outer membrane*, s. u.) in die entsprechenden mitochondrialen Kompartimente transportiert und ggf. modifiziert (Rak et al. 2016).

Die COX-Färbung färbt die drei mitochondrial kodierten, katalytischen Untereinheiten COX- I, -II und -III und ist zudem ein Marker für die Funktion der mitochondrialen DNA (mtDNA, *mitochondrial deoxyribonucleic acid*). Eine verminderte oder fehlende COX-Anfärbbarkeit, d. h. COX-Defizienz ist ein Zeichen für Abnormalitäten der COX-I, -II, -III bzw. der mitochondrialen Proteinsynthese (DiMauro et al. 2012). Das Enzym Succinat-Dehydrogenase (SDH) ist als Komplex II in der Atmungskette involviert und im Gegensatz zu der COX nukleär codiert. Mithilfe einer COX/SDH-Doppelfärbung können mitochondriale Veränderungen immunhistochemisch besser dargestellt werden.

Bei der IBM kann ein höherer Anteil an COX-defizienten Muskelfasern beobachtet werden als bei gleichaltrigen Kontrollpatienten (Oldfors et al. 1993). Dies deutet darauf hin, dass eine mitochondriale Dysfunktion eine Rolle in der IBM-Pathogenese spielen könnte. Auch das Vorhandensein von *red-ragged-fibers* in IBM ist ein Hinweis auf eine mitochondriale Beteiligung und unterstützt somit die Relevanz von mitochondrialen Abnormalitäten bei IBM, ist aber nicht spezifisch für eine COX-Defizienz (Rak et al. 2016). Zudem wird vermutet, dass COX-defiziente Muskeln bei der IBM mit mitochondrialen Deletionen einhergehen (Lindgren et al. 2015). In einer Untersuchung von 86 IBM-Biopsien konnten in 98 % der Biopsien COX-defiziente Fasern nachgewiesen werden. Die Zahl der Muskelfasern mit

COX-Defizienz nimmt auch in der Normalbevölkerung mit dem Alter zu, liegt aber mit ca. 66-83 % bei den 51- bis 97-Jährigen unter der COX-Defizienz-Rate bei IBM-Patienten (Müller-Höcker 1990).

1.2.5 C5b-9

Das Komplementsystem ist ein Teil des humoralen Immunsystems und ist zusammengesetzt aus einzelnen Komplementkomponenten, die den sog. Membranangriffskomplex (MAK, auch engl.: *membrane attack complex*, MAC) bilden. C5b-9 ist das Resultat aus den verschiedenen Komplementkomponenten und wird somit als *terminal-membran-attack-complex* bezeichnet. Durch den MAK wird in der Zielzelle eine Pore in der Zellmembran gebildet, die zum Untergang der Zelle führt. Die Ablagerung von C5b-9 an intramuskuläre Arteriolen und Kapillaren ist ein Marker für die Dermatomyositis (Kissel et al. 1986). In der IBM gehört C5b-9 bis auf Einzelfälle (Buchman et al. 2016) nicht zu den typischen histopathologischen Markern.

1.2.6 Protein p62

Das Protein p62 (auch: Sequestosom 1, SQSTM1) spielt eine Schlüsselrolle bei der Protein-degradation und Autophagie. Wenn die Autophagie beeinträchtigt ist, sammeln sich Autophagosomen an (Hiniker et al. 2013), die durch immunhistochemische Färbung von p62 nachgewiesen werden können. Das Protein p62 ist ein Transportprotein, das polyubiquitinierte Proteine zur Degradation in Lysosomen und Proteasomen leitet (Nogalska et al. 2009).

P62 kann nicht-kovalent an Ubiquitin binden und ist somit involviert in die Regulation des Ubiquitin-Systems (Kuusisto et al. 2001). Am Beispiel von tau, das über Ubiquitin und Proteasomen abgebaut wird, konnte gezeigt werden, dass p62 mit polyubiquitiniertem tau interagiert und der Degradation in Proteasomen zuführt (Babu et al. 2005). Somit ist p62 an der Regulierung des proteasomalen Abbaus von tau und auch anderen Proteinen beteiligt (Hiniker et al. 2013). Wenn Transportproteine wie p62 die Proteine nicht dem Abbau zuführen oder das Proteasom gestört ist, können polyubiquitinierte Proteine im Zytoplasma akkumulieren (Babu et al. 2005). Sie bilden unlösliche Aggregate, die charakteristisch für neurodegenerative Krankheiten wie beispielsweise Morbus Parkinson sind (Lang-Rollin et al. 2003). Es wurde *in vitro* an Neuroblastomzellen von Mäusen und hippocampalen Neuronen von Ratten festgestellt, dass eine vermehrte Expression von p62 durch Inhibitoren des Proteasoms ausgelöst wird, wobei die p62-Hochregulation mit einer vermehrten Akkumulation ubiquitiniertes Proteine einhergeht (Kuusisto et al. 2001). Die Autoren der Studie stellten die Vermutung auf, dass es durch eine Erhöhung ubiquitiniertes Proteine zu einer vermehrten p62-Expression kommen könnte.

In IBM wird p62 zusammen mit *paired helical filaments* (PHF) angefärbt, die wiederum phosphoryliertes tau enthalten. Die gefärbten Aggregate befinden sich bei IBM im Zytoplasma

von ca. 80 % der vakuolisierten Muskelfasern bzw. bei 20-25 % der Fasern, die keine sichtbaren Vakuolen im histologischen Schnitt zeigen (Askanas et al. 2015). Bei der Einschlusskörpermyositis ist p62 sowohl auf Protein- als auch mRNA(*messenger ribonucleic acid*)-Ebene erhöht und ist ein Zeichen von einer gestörten Proteindyshomöostase (Nogalska et al. 2009). In den ENMC-Kriterien für IBM (s. o.) ist für das Vorliegen von Proteinakkumulation als IBM-Diagnose-Kriterium ein Nachweis von p62 zulässig. Dies zeigt die Bedeutung von p62 als charakteristischen Marker in der IBM. Zudem erlaubt die starke immunhistochemische p62-Anfärbbarkeit eine Differenzierung zwischen IBM und den vergleichsweise schwächer p62-positiv angefärbten Muskelgeweben von DM und PM (Nogalska et al. 2009).

1.2.7 α -Synuklein

Das Protein α -Synuklein spielt eine wichtige Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und der Lewy-Körper-Demenz. Die Gruppe der durch α -Synuklein-Akkumulation gekennzeichneten neurodegenerativen Krankheiten wird auch als Synukleinopathien bezeichnet. Durch besondere Umstände, beispielsweise niedriger pH-Wert, oxidativer Stress oder genetische Mutationen, ballen sich lösliche α -Synuklein-Monomere zu unlöslichen Fibrillen zusammen (Benskey et al. 2016).

Auch bei der IBM, die durch Myodegeneration gekennzeichnet ist, kann α -Synuklein im Muskelgewebe nachgewiesen werden: Es ist einerseits in 60-70 % der β -Amyloid-positiven vakuolisierten Muskelfasern zu detektieren und andererseits sind regenerierende und nekrotische Muskelfasern für α -Synuklein positiv (Askanas et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass durch Interaktion von aggregiertem α -Synuklein mit Mitochondrien zunehmender mitochondrialer oxidativer Stress beobachtet werden kann, beispielsweise in Form von ansteigendem mitochondrialem Stickstoffmonoxid (engl: *nitric oxide*, NO) (Parihar et al. 2008).

Ein weiterer relevanter Zusammenhang, der bei der Pathogenese der IBM beteiligt sein könnte, ist, dass eine Überexpression des Hitzeschockproteins α BCrystallin im Zellmodell zu einer reduzierten intrazellulären Aggregation von α -Synuklein führt (Cox und Ecroyd 2017). Dies zeigt ebenfalls, dass α -Synuklein und Zellstress miteinander zusammenhängen.

1.2.8 TOM20

Die *translocase of the outer membrane*, kurz TOM, ist ein Komplex aus mehreren Proteinen an der äußeren Membran der Mitochondrien (Eliyahu et al. 2010). Er erkennt Proteine im Zytoplasma und vermittelt ihren Import durch die äußere Membran in das Mitochondrium hinein (Panigrahi et al. 2015). Der TOM-Komplex besteht aus sieben Untereinheiten, eine davon ist TOM20. TOM20, sowie TOM22 und TOM70 sind Rezeptoren für Vorläuferproteine. TOM20 erkennt Vorläuferproteine mit einem spaltbaren Zielsignal am N-terminalen Ende, die für einen Transport ins Mitochondrium bestimmt sind und leitet die Vorläuferproteine dann zu TOM22 weiter (Model et al. 2002).

Es konnte festgestellt werden, dass eine TOM20-Depletion zu einem stark verminderten Import von Vorläuferproteinen ins Mitochondrium führt (Harkness et al. 1994). Eine Überexpression von TOM20 führt zu signifikanten Veränderungen der Struktur der Mitochondrien in *in vitro*-Studien. Es bilden sich riesige perinukleäre Aggregate, die vermutlich durch ein Aneinanderlagern von Mitochondrien mit TOM20-Überexpression entstehen (Yano et al. 1997). Des Weiteren wurde in derselben Studie beobachtet, dass die TOM20-Überexpression zu einer Stimulation des mitochondrialen Imports führt, die wiederum der Grund für die Aggregation der Mitochondrien sein könnte.

Auch das Protein α -Synuklein steht in Zusammenhang mit mitochondrialen Abnormalitäten. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Arten von α -Synuklein spezifisch an TOM20 binden. Dies führe zu einer gestörten Interaktion mit TOM22 und daraus resultierender Blockierung des mitochondrialen Imports von Proteinen. In Folge sei die mitochondriale Funktionsfähigkeit eingeschränkt, was beispielsweise zu weniger Energieproduktion und starker Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*, kurz: ROS) führe (Devi et al. 2008). In der gleichen Studie konnte zudem gezeigt werden, dass eine TOM20-Überexpression diesen Mechanismus verhindere, somit komme es nicht zu einer durch α -Synuklein hervorgerufenen Beeinträchtigung des mitochondrialen Imports.

In Zusammenschau kann festgestellt werden, dass eine TOM20-Überexpression zu einer veränderten Mitochondrien-Struktur und zu einem gesteigerten mitochondrialen Import zu führen scheint. Durch Verhinderung der α -Synuklein-TOM20-Bindung durch TOM20-Überexpression ist zudem die Import-blockierende Wirkung und die Funktionseinschränkung des Mitochondriums durch α -Synuklein aufgehoben.

Auch das Hitzeschockprotein α BCrystallin interagiert in Kardiomyozyten mit TOM20 (Chis et al. 2012) und wird bei oxidativem Stress vom Zytosol ins Mitochondrium transportiert. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus die Apoptose von Kardiomyozyten verhindern könnte.

1.2.9 iNOS

Die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) ist eine Isoform der NO-Synthasen, deren Expression durch Entzündungsmediatoren wie Lipopolysaccharide und Interferon- γ (IFN- γ) stimuliert wird (Wang T et al. 2018). Nach Induktion produziert die iNOS Calcium-unabhängig *nitric oxide*, also Stickstoffmonoxid (NO). NO hat eine ambivalente Funktion im Immunsystem (Xue et al. 2018). Einerseits ist es zytotoxisch wirksam und kann beispielsweise mikrobielle Erreger, Viren und Tumorzellen bekämpfen (Wang T et al. 2018) und als protektiver Radikalfänger wirken. Andererseits hat NO auch destruktive Eigenschaften und kann Proteine sowie die DNA schädigen und so den Untergang von Zellen bzw. Gewebe bewirken. Zudem kann sich die immunologische Effektivität von NO ebenso in chronischen Entzündungsreaktionen äußern.

NO ist ein potenter Radikalfänger und verursacht über reaktive Stickstoffspezies (engl.: *reactive nitrogen species*, RNS) nitrosativen Stress. Bei oxidativem bzw. nitrosativem Stress handelt es sich um ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau von reaktiven Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies (ROS bzw. RNS). Bei IBM ist die Bezeichnung „nitrosativer Stress“ treffender als „oxidativer Stress“, dennoch wird letztere Bezeichnung häufiger verwendet. An der IBM konnte erstmals ein NO-induzierter oxidativer Stress in einer Muskelerkrankung nachgewiesen werden (Yang et al. 1996), wobei die iNOS bei der IBM sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene erhöht ist (Schmidt et al. 2012). Die iNOS-Überexpression ist bei IBM häufiger zu beobachten als bei DM oder PM (Schmidt et al. 2012).

Bei der IBM kann die iNOS als Einschlüsse in den Vakuolen bzw. im Vakuolen-freien Zytoplasma bei einem Großteil der vakuolisierten Muskelfasern nachgewiesen werden (Yang et al. 1996). Die iNOS unterstützt zum einen die Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress, ist aber auch an der anhaltenden, IBM-typischen Inflammation im betroffenen Muskelgewebe beteiligt. In Muskelzellkulturen konnte gezeigt werden, dass durch eine Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen Interleukin-1 β (IL-1 β) und IFN- γ eine iNOS-Hochregulation ausgelöst werden kann. Auf die intrazelluläre NO-Produktion wiederum folgte eine Akkumulation von β -Amyloid und anschließendem Zelltod (Schmidt et al. 2012). Die Mechanismen bedingen sich auch umgekehrt: ebenfalls *in vitro* war zu beobachten, dass IFN- γ und β -Amyloid (genauer: Amyloid- β 40, kurz A β 40 und Amyloid- β 42, kurz A β 42) gemeinsam eine NO-Produktion und gesteigerte iNOS-mRNA-Akkumulation stimulieren können, wohingegen IFN- γ und β -Amyloid einzeln dies nicht bewirken (Baron et al. 2000). In dieser Studie konnte außerdem im Zuge der NO- und iNOS-Stimulation in einigen Zellen eine DNA-Fragmentierung als Hinweis auf Apoptose entdeckt werden.

Somit kann eine vermehrte iNOS-Expression durch inflammatorische Reize mittels IL-1 β und IFN- γ oder durch Proteinakkumulation von β -Amyloid in Kombination mit IFN- γ ausgelöst werden. Da NO wiederum zu β -Amyloid-Akkumulation führt, ist dies ein Kreislauf an dessen Ende der Untergang der betroffenen Muskelfaser steht. Der NO-induzierte oxidative Stress hat somit drastische Auswirkungen auf die betroffene Muskulatur bei der IBM.

1.2.10 β -Amyloid

In den Muskelfasern von IBM-Patienten lagert sich β -Amyloid (A β) ab (Askanas und Engel 2006). Einer der am besten etablierten Antikörper, die β -Amyloid detektieren, ist der Klon 6E10, der gegen den Bereich der Aminosäuren 1-16 gerichtet ist. Erstmals entdeckt wurde β -Amyloid in Blutgefäßen von Morbus Alzheimer-Patienten (Glennner und Wong 1984) und konnte später als Bestandteil der senilen Plaques im Gehirn von Alzheimer-Patienten identifiziert werden. Das Vorkommen von β -Amyloid-Akkumulation in Krankheiten, welche die Skelettmuskulatur betreffen, wurde erstmals für die IBM beschrieben (Askanas et al. 1992). Die Myodegeneration bei IBM ist erkennbar an intrazytoplasmatischen Vakuolen (s. o.) und

an der Akkumulation von fehlgefalteten, ubiquitinierten Proteinaggregaten. A β ist sowohl in Morbus Alzheimer als auch in IBM ein Beispiel der abnormen Proteinakkumulation und ist charakteristisch für die Mechanismen der Neuro- bzw. Myodegeneration beider Krankheitsbilder (Askanas et al. 2015).

Aus dem Vorläufer *amyloid precursor protein* (APP) entstehen zwei Varianten des A β : A β 40 und A β 42, wobei die Zahl die Länge der Aminosäuren angibt. A β -Monomere können zu Amyloid-Fibrillen und weiter zu Amyloid-Plaques akkumulieren (Chen et al. 2017). Bei der IBM dominiert A β 42 (Askanas und Engel 2006), was eine stärkere Neigung zum Oligomerisieren hat als A β 40 und als zytotoxischer gilt (Nogalska et al. 2010). Bei IBM akkumulieren neben APP und A β auch weitere Proteine, so wie beispielsweise phosphoryliertes tau (p-tau) zu Protein-Aggregaten (Askanas et al. 2009), die sich als Amyloid in vakuolisierten Muskelfasern ablagern. Die Amyloid-Ablagerungen befinden sich dort vorrangig im nicht-vakuolisierten Zytoplasma (Engel und Askanas 2006), aber auch in den Vakuolen selbst (Dubourg et al. 2011). Akkumuliertes APP und A β werden markiert, um durch lysosomale Degradation mittels Makroautophagie abgebaut zu werden (Lünemann et al. 2007).

Die intrazellulären Einschlüsse bei der IBM beinhalten entweder A β oder p-tau, wobei beide Typen Ubiquitin enthalten und „amyloid“-positiv sind, d. h. Proteine in der β -Faltblatt-Konformation beinhalten. Neben A β und p-tau enthalten die Einschlüsse weitere akkumulierte Proteine, die durch Entfaltung und Fehlfaltung zu β -Faltblatt-konformiertem Amyloid werden können, so wie beispielsweise α -Synuklein (Askanas und Engel 2003). Die Protein-Ansammlungen in β -Faltblatt-Konformation lassen sich mit Kristallviolett, Congo-Rot u. a. anfärben, was wiederum charakteristisch für IBM ist und somit auch in den ENMC-Kriterien der IBM berücksichtigt wird.

Physiologisch werden fehlgefaltet bzw. entfaltete, Ubiquitin-markierte Proteine durch Proteasomen abgebaut. Es konnte allerdings erkannt werden, dass unter anderem durch APP- und A β -Überexpression (Fratta et al. 2005), α -Synuklein (Lindersson et al. 2004) und mutiertes Ubiquitin (Fratta et al. 2004) die Funktion vom Proteasom eingeschränkt wird. Durch Beeinträchtigung der Proteasomen können die fehlerhaften Proteine nicht mehr abgebaut werden, wodurch eine Proteinakkumulation wie bei der IBM entstehen kann. Da Proteasomen eigentlich geschädigte oxidative Proteine abbauen sollen, sind bei einer verminderten Proteasomaktivität die Zellen in geringerem Maße vor oxidativem Stress geschützt (Aiken et al. 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von APP signifikant mit IFN- γ und eng mit IL-1 β zusammenhängt und fast alle β -Amyloid-positiven Muskelfasern MHC I exprimierten (Schmidt et al. 2008). Dies zeigt, dass das Vorkommen von β -Amyloid und Inflammation in enger Beziehung zueinander stehen. Zudem wurde *in vitro* beobachtet, dass

eine Stimulation von Myotuben mit IL-1 β und IFN- γ zu einer vermehrten Expression von APP und β -Amyloid-Akkumulation führt (Schmidt et al. 2008).

1.2.11 α BCrystallin

α BCrystallin (auch: HSPB5) ist ein kleines Hitzeschockprotein (engl.: *heat shock protein*, HSP). Dabei handelt es sich um eine Klasse von Proteinen, die durch eine Temperaturerhöhung und andere Zellstress-Zeichen vermehrt exprimiert werden und akkumulieren können (Klemenz et al. 1991). α BCrystallin wirkt als molekulares Chaperon, das fehlgefaltete Proteine bindet und somit vor Aggregation schützt (Dillmann 1999). Im Unterschied zum normalen Chaperon können molekulare Chaperone nicht eine korrekte Faltung der Proteine bewirken, sondern lediglich falsch-konformierte Proteine erkennen und binden.

Es konnte gezeigt werden, dass α BCrystallin vermehrt exprimiert wird, wenn es den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und IFN- γ ausgesetzt wird. Zudem scheint es als Folge einer verstärkten α BCrystallin-Expression zu einer Akkumulation von β -Amyloid zu kommen. Da die Expression von APP und α BCrystallin signifikant miteinander korrelieren, sind diese Prozesse Ausdruck der Zusammenhänge von Zellstress (α BCrystallin), Inflammation (IL-1 β und IFN- γ) und Degeneration (β -Amyloid-Akkumulation) (Muth et al. 2009).

Als histopathologische Besonderheit ist bei der IBM zu nennen, dass ein Großteil der Fasern, die nur APP- oder nur α BCrystallin-positiv sind, eine normale Morphologie zeigen. Hingegen sind die Muskelfasern, die sich sowohl für APP als auch für α BCrystallin positiv anfärben lassen, sichtbar geschädigt, weil sie beispielsweise Vakuolen enthalten oder atroph sind (Muth et al. 2009). Da α BCrystallin auch schon in Muskelfasern mit normal erscheinender Morphologie nachweisbar ist, wird angenommen, dass es sich um einen frühen Prozess in der IBM-Pathogenese handelt.

Die Muskelfasern, die sich morphologisch bzw. strukturell unauffällig darstellen, aber positiv für α BCrystallin sind, werden *x-fibers* genannt (Banwell und Engel 2000) und sind charakteristisch für die IBM. In PM und DM wird α BCrystallin deutlich weniger exprimiert (Keller et al. 2017), sodass es als differenzialdiagnostisches Unterscheidungsmerkmal genutzt werden kann.

1.3 Ziele der Arbeit

Obwohl bereits zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten veröffentlicht wurden, sind die Ätiologie und die genaue Pathogenese der IBM weiterhin nicht abschließend geklärt. Zwar wurden histopathologische Marker, klinische Merkmale und epigenetische Faktoren schon von zahlreichen Arbeitsgruppen ausführlich untersucht, dennoch sind viele Aspekte weiterhin

unklar. Insbesondere das genaue Zusammenspiel und die Reihenfolge der für IBM charakteristischen Parameter konnte bisher nur hypothetisch erklärt werden. Da für IBM-Patienten bisher keine etablierte, wirkungsvolle Therapie angeboten werden kann, sondern die Patienten auf individuelle Therapieversuche bzw. symptomatische Behandlungen angewiesen sind, ist ein besseres Verständnis der Krankheitsentstehung und -aufrechterhaltung der IBM notwendig, um gezielte Therapien zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit soll mithilfe drei verschiedener Methoden die Histopathologie der IBM näher beleuchtet werden, um möglicherweise neue Zusammenhänge zu detektieren bzw. bereits aufgestellte Hypothesen zu bestätigen.

Besonderes Augenmerk dieser Arbeit liegt auf der Bedeutung von Zellstress in der Pathogenese der IBM. Hierfür ist insbesondere der Zellstressmarker α BCrystallin im Fokus, aber auch mit Zellstress assoziierte Mechanismen wie beispielsweise die Expression der iNOS werden untersucht. Bisher gibt es nur wenig Studien zu Zellstress bzw. α BCrystallin bei IBM, diese zeigten aber aufschlussreiche Zusammenhänge beispielsweise zu β -Amyloid und APP (Muth et al. 2009).

Der Einsatz von TOM20-Immunfluoreszenz bei IBM-Patienten ist innovativ. Zwar ist für IBM nachgewiesen, dass es mitochondriale Abnormitäten gibt, beispielsweise sichtbar als *red-ragged-fibers* oder COX-Defizienz. Inwieweit aber der Transport von Vorläuferproteinen Störungen unterliegt, die sich in einer veränderten TOM20-Anfärbung zeigen könnten, ist aktuell noch nicht für die IBM erforscht. TOM20 könnte mit der gestörten Proteinhomöostase bei IBM assoziiert sein; so könnte eine veränderte Expression von TOM20 als Auslöser oder Begleiterscheinung bzw. Folge der Proteinakkumulation womöglich eine vorliegende IBM andeuten.

Anhand einer Fallstudie eines IBM-Patienten können ausgewählte histopathologische Marker an mehreren posthum entnommenen Muskelproben ausgewertet werden. Somit kann bei dem Patienten untersucht werden, welche Prozesse simultan in verschiedenen Muskeln ablaufen. Da im Zuge der IBM-Diagnostik in der Regel nur eine Muskelbiopsie entnommen wird, ist ein solcher Überblick über mehrere Muskelproben eines Zeitpunktes in der Pathogenese außergewöhnlich. Zudem liegen die Ambulanzbriefe des Patienten vor, sodass untersucht werden kann, inwieweit die klinische Symptomatik und die histopathologischen Befunde miteinander korrelieren. Da die ENMC-Kriterien sowohl klinische als auch pathologische Merkmale für die IBM-Diagnostik berücksichtigen, ist eine Untersuchung des Zusammenspiels von Relevanz.

Die Laser-Mikrodissektion (LMD, auch: *laser capture microdissection*, LCM) ist ein spezielles Verfahren, mit dem aus den Biopsien ausgewählte Muskelfasern näher analysiert werden können. Durch Herausschneiden von α BCrystallin-positiven Muskelfasern und nachfolgen-

der *ribonucleic acid*(RNA)-Extraktion kann Material für eine *micro ribonucleic acid*(miRNA)-Sequenzierung bereitgestellt werden. Dies bietet die Möglichkeit, bei IBM nach epigenetischen Faktoren zu fahnden, die in den Zellstress-positiven Fasern auftreten.

Durch Einzelfaseranalyse von IBM-Biopsien kann dargestellt werden, welche Marker simultan in der gleichen Muskelfaser exprimiert werden. So kann das Zusammenspiel der einzelnen Marker zueinander und die Beteiligung von TOM20 in der Pathogenese der IBM untersucht werden. Zudem kann analysiert werden, welche Marker zeitgleich mit dem Zellstressmarker α BCrystallin in der gleichen Muskelfaser nachweisbar sind.

Durch die drei Ansätze kann eine histopathologische Charakterisierung von Muskelzellstress bei der IBM vorgenommen und die Bedeutung von Zellstress im Zusammenspiel von Inflammation, Proteinakkumulation und Myodegeneration besser erfasst werden.

2 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit vereint die Ergebnisse von drei verschiedenen histologischen Ansätzen, um die Pathogenese der IBM besser zu verstehen. Im Folgenden werden Material und Methoden der drei Herangehensweisen voneinander getrennt beschrieben.

In Tabelle 2 sind die verwendeten Materialien und Geräte alphabetisch aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien mit Angabe des Herstellers und ggf. einer näheren Produktbezeichnung.

Geräte und Materialien	Hersteller, ggf. nähere Bezeichnung
Ceramic beads 1,40 mm	Sigmund Lindner GmbH
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr Premium
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific HERAfreeze
Kryostat	Leica CM3050 S
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr Profi Line
MembraneSlides RNase free	MMI, 50102
Mikro-Schraubröhre 2 ml, PP (Homogenisator-Röhrchen)	Sarstedt
Mikroskop	Olympus IX71
NanoDrop One Spektralphotometers	Thermo Fisher Scientific
Reaktionsröhrchen IsolationCaps 0,5 ml	MMI, 50202
Scanner-Mikroskop	Olympus VS-120
Software	MMI CellTools
System für die Laser-Mikrodissektion	MMI CellCut Plus

Die genutzten Chemikalien sind inklusive des Herstellernamens in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien mit Angabe des jeweiligen Herstellers.

Chemikalie	Hersteller, ggf. Artikelnummer
0,03 %, 0,05% Triton X100	MP Biomedicals
0,1 % Eosin	Merck
1 % Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth
1 %, 5%, 10 % <i>bovine serum albumine</i> (BSA)	Serva
10 % <i>bovine serum albumine</i> (BSA)	Carl Roth
10 % <i>goat serum donor herd</i> (auch: Goat)	Sigma-Aldrich
4 % Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1:10.000	Invitrogen
5 % <i>normal goat serum</i> (NGS)	Jackson ImmunoResearch
50 %, 70 %, 90 %, 100 % Ethanol	Chemie-Betrieb Hannover
70 % Dimethylformamid	Sigma
Aceton	Merck
Ampuwa-Wasser	Fresenius
Aqua bidest. (<i>aqua bidestillata</i>)	
Aqua dest. (<i>aqua destillata</i>)	
Catalase-Lösung	Sigma
Chloroform	Carl Roth
Chromotrop R2	Fluka
Cytochrom C	Sigma
DAB (Diaminobenzidine)	Sigma
DePeX	Serva
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Entellan	Merck
Essigsäure	Merck
Fast Green (Lichtgrün)	Serva
Fluoromount	Invitrogen
Isopropanol	Thermo Fisher Scientific
Isopropanol	Chemie-Vertrieb Hannover

Chemikalie		Hersteller, ggf. Artikelnummer
Kalium-Di-Hydrogenphosphat		Merck
Mayers Hämalaun		Merck
Methanol		Merck
Natriumsuccinat		Serva
Nitrotetrazoliumbluechloride (NBT)		Sigma
<i>phosphat buffered saline</i> (PBS)		Anprotec
<i>phosphat buffered saline</i> (PBS)		AppliChem
Phosphatpuffer pH 7,4		Merck
QIAzol (Trizol)		Qiagen
REAL EnVision De- tection System Perox- idase/DAB+	Lösung A: Dako REAL En- Vision/HRP = mit Peroxi- dasemolekülen und sekun- därem <i>rabbit-anti-mouse</i> -Anti- körper gekoppeltes Dextran	Dako
	Lösung B: Dako REAL <i>sub- strate buffer</i>	Dako
	Lösung C: Dako REAL DAB + Chromogen	Dako
RNA Clean & Concentrator-5		Zymo Research, R1014
RNase ZAP		Sigma-Aldrich
RNeasy Mini Kit		Qiagen, 74106
Sucrose		Sigma
Trichloressigsäure		Merck
Wolframtophosphorsäure		Merck
Xylol		Baker

Die bei den Fluoreszenzfärbungen verwendeten Erst- und Zweitantikörper sind mit dem jeweiligen Hersteller und der Artikelnummer in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Antikörper für die Fluoreszenzfärbungen. Angegeben sind die Bezeichnung, der Hersteller und die Artikelnummer.

Antikörper	Hersteller und Artikelnummer
anti- α BCrystallin, <i>mouse monoclonal</i>	Abcam, Ab13496
anti- α BCrystallin, <i>mouse monoclonal</i>	Novocastra (Leica), NCL-ABCrys-512
anti-Beta-Amyloid (A β) 1-16 (6E10), <i>mouse monoclonal</i>	Covance, SIG-39320
anti-MHC I-Antikörper, <i>mouse monoclonal</i>	Dako, M0736
<i>anti-nitric oxide synthetase II (iNOS), rabbit polyclonal</i>	Millipore, Ab5384
anti-p62 Ick ligand Antikörper, <i>mouse monoclonal</i>	BD Biosciences, 610833
anti-TOMM20-Antikörper, <i>rabbit polyclonal</i>	Abcam, Ab78547
<i>goat-anti-mouse</i> Alexa 488 IgG	Invitrogen, A-11001
<i>goat-anti-mouse</i> Alexa 594 IgG	Invitrogen, A-11005
<i>goat-anti-mouse</i> Cy3 IgG	Invitrogen, A-10521
<i>goat-anti-rabbit</i> Alexa 594 IgG	Invitrogen, A-11012
<i>goat-anti-rat</i> Alexa 488 IgG	Invitrogen, A-11006

In den Versuchen wurden Biopsien von neuromuskulär erkrankten und gesunden Personen verwendet. In Tabelle 5 sind die Patientenproben aufgelistet.

Tabelle 5: Patientenproben für die verschiedenen Versuche. Angegeben sind die Erkrankung, der jeweilige Name der Patientenprobe und die Verwendung.

Erkrankung	Patientenprobe	Verwendung
IBM	Fallstudie	19 posthum entnommene Muskelbiopsien für die Fallstudie
IBM	Biopsie 1	Einzelfaseranalyse
	Biopsie 2	
	Biopsie 3	
	Biopsie 4	
IBM	Biopsie 3	LMD
	Biopsie 4	

Erkrankung	Patientenprobe	Verwendung
IBM	Biopsie 5	LMD
	Biopsie 6	
Dermatomyositis	Biopsie 7	LMD
Nekrotisierende Myopathie	Biopsie 8	LMD
	Biopsie 9	
Polymyositis	Biopsie 10	LMD
	Biopsie 11	

2.1 Fallstudie

Mithilfe der Fallstudie konnte erstmals anhand posthum entnommener Muskelproben eines IBM-Patienten eine histopathologische Analyse mehrerer Muskeln zum gleichen Zeitpunkt erfolgen. In der Regel wird zur Diagnosesicherung bei Verdacht auf IBM eine Muskelbiopsie aus einem Muskel entnommen und nur selten, bei z. B. diagnostischer Unsicherheit, werden noch weitere Muskeln histopathologisch untersucht. Der Patient der Fallstudie hat zu Lebzeiten zugestimmt, seinen Körper posthum für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung zu stellen, um die IBM-Forschung zu unterstützen. Nach dem Tod wurden dem Patienten im Zuge einer Obduktion 19 Muskelproben entnommen, wodurch der histopathologische Vergleich mehrerer Muskeln möglich war. Abgesehen von der großen Zahl an Proben von einem Patienten sind zwei weitere Aspekte relevant für die Auswertung der Ergebnisse: Einerseits wurden alle Muskelproben zum gleichen Zeitpunkt entnommen, d. h. die histopathologischen Gewebsveränderungen der einzelnen Proben repräsentieren parallel ablaufende Prozesse in unterschiedlichen Körperpartien. Andererseits wurden bei dem Patienten im Krankheitsverlauf die Ergebnisse der klinischen Untersuchung dokumentiert, was einen Vergleich der Histopathologie mit der Klinik ermöglicht.

2.1.1 Krankheitsverlauf

Der Patient stellte sich erstmalig mit 68 Jahren in der Neuromuskulären Spezialambulanz der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) vor. Er beschrieb eine seit fünf Jahren bestehende progressive Schwäche beider Beine mit Betonung in den Oberschenkeln, Schwäche in den Finger Muskeln und Dysphagie. Mithilfe der ENMC-Kriterien (siehe Kapitel 1.1) und eines auswärtigen Muskelbiopsiebefundes wurde die Diagnose einer sIBM gestellt. Als Therapieversuch erhielt der Patient alle acht Wochen 60 bis 140 g IVIG. Da der Patient Nebenwirkungen befürchtete, wurde die IVIG-Therapie trotz positiven Ansprechens unterbrochen, später allerdings auf Wunsch des Patienten wieder eingeleitet. Sowohl subjektiv vom Patienten beschrieben als auch objektiv mittels *inclusion body myositis functional rating scale* (IBMFRS)

(siehe Kapitel 2.1.4) und Medical Research Council(MRC)-Kraftgrade (Compston 2010) dokumentiert, nahmen die Symptome im Krankheitsverlauf zu.

Als Folge eines Sturzes im häuslichen Umfeld verstarb der Patient im Alter von 72 Jahren.

2.1.2 Material und Färbungen

Im Zuge einer selektiven Muskelautopsie wurden dem Patienten posthum 19 verschiedene Muskelproben (1 x 1 x 1 cm) entnommen und kryoasserviert. Das Muskelgewebe wurde in Serienschnitte geschnitten, mit einem Zahlencode pseudonymisiert und anschließend vom Team der zuständigen Neuropathologie mit H.E., Trichrom und gegen COX-I, CD8⁺, MHC I, C5b-9, α BCrystallin und p62 immunhistochemisch gefärbt.

2.1.3 Histopathologische Auswertung

Die histologischen Schnitte wurden mit einem Zeiss AxioVert 200M Durchlicht-Mikroskop ausgewertet. Für jede Färbung wurden in 20-facher Vergrößerung zufällig vier Sichtfelder (eins pro Quadrant) betrachtet, aufgenommen und dokumentiert. Wenn der zufällig ausgewählte Ausschnitt zum Großteil aus längs getroffenen Muskelfasern oder Artefakten bestand, dann wurde stattdessen ein anderes beliebiges Sichtfeld in diesem Quadranten gewählt, um eine möglichst unverfälschte Auswertung zu ermöglichen.

2.1.3.1 Auswertung der Färbungen

In der Trichrom-Färbung wurden die *red-rimmed vacuoles* innerhalb des Sichtfelds gezählt. Bei den Färbungen CD8⁺, MHC I, C5b-9, α BCrystallin und p62 wurden die positiv angefärbten Zellen pro Sichtfeld quantitativ erfasst, bei der COX-Färbung hingegen die COX-negativen Zellen (d. h. COX-defiziente Zellen). Die gezählten positiven bzw. COX-negativen Muskelfasern wurden in Relation zu der Gesamtzellzahl im Sichtfeld gesetzt, sodass sich eine durchschnittliche Prozentzahl der histopathologisch auffälligen Muskelfasern im Schnitt ergab.

2.1.3.2 Auswertung des Muskelfaser-Durchmessers

Für die Messung des Muskelfaser-Durchmessers wurde in H.E. ein zufälliger Ausschnitt pro Muskelschnitt gewählt und der Durchmesser aller Muskelfasern in diesem Sichtfeld (in 20-facher Vergrößerung) mithilfe der Zeiss AxioVision-Software gemessen. Als Durchmesser wurde jeweils der schmalere Durchmesser erhoben, da er am ehesten den tatsächlichen Faserquerschnitt widerspiegelt (Dubowitz et al. 2006), siehe Abbildung 1. Offensichtlich längs getroffene oder am Rand des Sichtfelds angeschnittene Muskelfasern wurden nicht berücksichtigt.

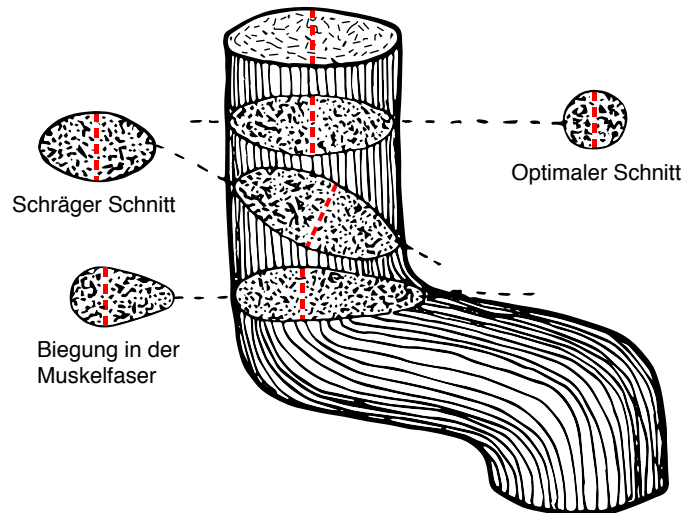


Abbildung 1: Ermittlung des Muskelfaserdurchmessers.

Um Verfälschungen durch schräge Anschnitte oder Biegungen in der Muskelfaser zu vermeiden, wird der schmalere Faserdurchmesser gemessen. Basierend auf einer Abbildung von Dubowitz et al. 2006, Kapitel 4.

Aus den ermittelten Muskelfaser-Durchmessern konnte der Atrophie- und Hypertrophie-Faktor bestimmt werden (Brooke und Engel 1969). Hierfür wird ein Referenzwert von 30 bis 70 μm als normaler Muskelfaserdurchmesser bei Frauen angenommen. Die atrophischen und hypertrophischen Fasern außerhalb des Referenzwertes bekommen einen entsprechenden Faktor, je nachdem wie ausgeprägt die Abweichung vom Normwert ist. Die Rechnung berücksichtigt somit, dass beispielsweise eine Faser mit 10 μm Durchmesser einen stärkeren Einfluss auf den Atrophiefaktor hat als eine mit 20 μm Durchmesser (Dubowitz et al. 2006). Die jeweiligen Grenzwerte und zugehörigen Faktoren sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Muskelfaserdurchmesser in μm als Grenzwerte für die Berechnung des Atrophie- und Hypertrophiefaktors bei Frauen.

	Muskelfaserdurchmesser in μm	Faktor
Referenzwert bei Frauen	30-70 μm	x 0
Atrophie	< 9,99 μm	x 3
	10-19,99 μm	x 2
	20-29,99 μm	x 1
Hypertrophie	70-79,99 μm	x 1
	80-89,99 μm	x 2
	90-99,99 μm	x 3
	> 100 μm	x 4

Die Anzahl der Fasern pro Intervall werden mit dem jeweiligen Faktor multipliziert und addiert, durch die Gesamtanzahl der Fasern im Sichtfeld dividiert und anschließend mit 1000 multipliziert. Das Ergebnis ist der durchschnittliche Atrophie- bzw. Hypertrophiefaktor des Schnittes.

Atrophiefaktor:

$$\frac{(Anzahl\ 20 - 29,99\ \mu m \times 1) + (Anzahl\ 10 - 19,99\ \mu m \times 2) + (Anzahl\ < 9,99\ \mu m \times 3)}{Gesamtzahl\ der\ gezählten\ Fasern\ im\ Ausschnitt} \times 1000 = Atrophiefaktor$$

Hypertrophiefaktor:

$$\frac{(Anzahl\ 70 - 79,99\ \mu m \times 1) + (Anzahl\ 80 - 89,99\ \mu m \times 2) + (Anzahl\ 90 - 99,99\ \mu m \times 3) + (Anzahl\ > 100\ \mu m \times 4)}{Gesamtzahl\ der\ gezählten\ Fasern\ im\ Ausschnitt} \times 1000 = Hypertrophiefaktor$$

2.1.4 Klinisch-neurologischer Untersuchungsbefund

Im Zuge der regelmäßigen Vorstellung in der Neuromuskulären Spezialambulanz der UMG wurde bei dem Patienten ein klinisch-neurologischer Untersuchungsbefund erhoben. Aus dem letzten vorliegenden Ambulanzbrief kann man ableiten, welche Muskeln bzw. Muskelgruppen bei dem Patienten vier Monate vor seinem Tod klinisch betroffenen waren.

Es wurden bei dem Patienten die Medical Research Council(MRC)-Kraftgrade (Compston 2010) erhoben. Hierbei wird die Ausprägung der Muskelschwäche der Extremitäten in die Kraftgrade 0 (= keine Muskelkraft) bis 5 (= volle Kraft gegen Widerstand) eingeteilt, wobei bei Kraftgrad 4 Abstufungen mittels „+“ bzw. „-“ möglich sind.

Die MRC-Kraftgrade (siehe Tabelle 7) ermöglichen eine semiquantitative Einschätzung der Kraft einzelner Muskeln und, da eine differenzierte Testung einzelner Muskeln oft nicht möglich ist, funktioneller Einheiten mehrerer Muskeln.

Tabelle 7: Medical Research Council(MRC)-Kraftgrade.

Kraftgrad	Beschreibung
5	normale Kraft
4	aktive Bewegung gegen Schwerkraft und Widerstand
3	aktive Bewegung gegen die Schwerkraft
2	aktive Bewegung unter Ausschaltung der Schwerkraft
1	Muskelzucken oder Spuren von Muskelkontraktion
0	keine Muskelkontraktion

Des Weiteren wurde bei dem Patienten die aktuelle Punktzahl in der *inclusion body myositis functional rating scale* (IBMFRS) erhoben (Jackson et al. 2008). Die IBMFRS wird genutzt, um die Schwere der Erkrankung und vor allem den Krankheitsverlauf beurteilen zu können. Es gibt zehn Kategorien, siehe Tabelle 8.

Tabelle 8: Die Tätigkeiten der zehn Kategorien der *inclusion body myositis functional rating scale*.

Kategorie	Tätigkeit
1	Schlucken
2	Handschrift
3	Essen schneiden und Utensilien benutzen
4	Feinmotorik z. B. Schlüssel benutzen
5	Ankleiden
6	Hygiene
7	Drehen im Bett und sich zudecken können
8	Vom Sitzen zum Stehen
9	Laufen
10	Treppen steigen

In jeder der zehn Kategorien werden 0 (nicht möglich) bis 4 (selbstständig und in normaler Ausführung möglich) Punkte vergeben. Es ergibt sich somit eine maximale Punktzahl von 40 Punkten.

Zudem wurde bestimmt, wie viele Punkte der Patient im sIFA (*sporadic inclusion body myositis physical functioning assessment*) hat. Dieser Score dient der Einschätzung der physischen Funktion des Patienten und somit auch einer Bewertung des Behandlungseffektes (DeMuro et al. 2016).

Der Faustschluss wurde mithilfe eines Vigorimeters gemessen. Dieses gibt die Griffkraft in Kilopascal (kPa) an, die vor allem als Vergleichswert im Krankheitsverlauf und auch im Seitenvergleich interessant ist.

Einen Überblick über die Untersuchungsergebnisse des letzten Ambulanzbriefes vier Monate vor dem Tod des Patienten zeigt Tabelle 9. Der Patient war zu dieser Zeit 71 Jahre alt und seit der Diagnose waren drei Jahre vergangen.

Tabelle 9: Klinisch-neurologischer Untersuchungsbefund des letzten Ambulanzbriefes vor dem Tod des Patienten.

Untersuchung	Ergebnis (rechts/links)
KG Nackenbeugung	5
KG Nackenstreckung	5
KG Armabduktion	5/5
KG Armbeugung	4/4
KG Armstreckung	5/5
KG Handbeugung	4/4
KG Handstreckung	5/5
KG Fingerbeugung	5/4
KG Fingerstreckung	5/4
KG Hüftbeugung	4+/5
KG Hüftstreckung	5/5
KG Kniebeugung	5/5
KG Kniestreckung	5/5
KG Fußhebung	4/4
KG Fußsenkung	5/5
KG Bauchmuskulatur	5
Faustschluss in kPa	26/6
MER obere Extremität	++/++
MER untere Extremität	++/++
IBMFRS	26/40
sIFA	67
maximale Gehstrecke	100 m mit einseitiger Gehhilfe
Inspektion	beidseitige Oberschenkelatrophie

Aus dem Ambulanzbrief der Neuromuskulären Spezialambulanz der UMG entnommen. KG = Kraftgrad, MER = Muskeleigenreflex.

2.1.5 Statistik

Die graphische Darstellung und statistische Auswertung wurde mit dem Programm Graph-Pad Prism Version 8.3.0 unter Zuhilfenahme von Excel 16.30 durchgeführt. Für die Auswertung wurden einfache Prozentrechnung, Berechnung des Mittelwertes, Atrophie- und Hypertrophiefaktor (siehe Kapitel 2.1.3.2) und die Berechnung der Standardabweichung genutzt. Zudem wurde der Variabilitätskoeffizient der Muskelfaserdurchmesser bestimmt. Für die Korrelationsanalyse wurde ein Korrelationstest mit Korrelationskoeffizient nach Pearson angewendet.

2.2 Laser-Mikrodissektion

2.2.1 Ablauf

Die Laser-Mikrodissektion (LMD) ist ein Verfahren, bei dem mithilfe eines fokussierten Laserstrahls einzelne Zellen bzw. Zellverbände aus einem Gewebe gelöst werden können. So lassen sich gezielt die benötigten Zellen isolieren und molekularbiologisch analysieren. In der vorliegenden Arbeit sollten IBM-Patientenbiopsien mit einer α BCrystallin-Fluoreszenz-Färbung gefärbt werden und anschließend am LMD-Mikroskop unterschiedliche Zielstrukturen, siehe Tabelle 10, ausgeschnitten werden.

Tabelle 10: Zielstrukturen für die LMD mit den Kriterien α BCrystallin-Anfärbbarkeit und Morphologie der Muskelfaser.

Anfärbbarkeit	Morphologie
α BCrystallin-positiv	normale Morphologie
	abnorme Morphologie
α BCrystallin-negativ	normale Morphologie
	abnorme Morphologie

Als abnorme Morphologie wurden Faserkalibervariationen (d. h. Atrophie und Hypertrophie) als Kriterien genutzt, da diese morphologischen Veränderungen im Zuge der IBM beobachtet werden können. So ergeben sich aus den Kriterien α BCrystallin-Färbeverhalten und Morphologie insgesamt vier Zielstrukturen.

In einem α BCrystallin-gefärbten Schnitt wurden dann am LMD jeweils die Zellen, welche einer der vier Bedingungen entsprachen, ausgeschnitten. Die Zellen wurden gesammelt und in folgenden Schritten die RNA extrahiert. So sollten von jeder Biopsie für alle vier Bedingungen die passenden Fasern gewonnen und davon wiederum die RNA-Extraktion durchgeführt werden. Nachdem die RNA aller Zielstrukturen gesammelt wurde, sollten diese einer

miRNA-Sequenzierung unterzogen werden. Durch Identifikation und Vergleich der in den Zielstrukturen vorhandenen miRNA könnten dann mögliche epigenetische Modifikationen in histopathologisch betroffenen Muskelfasern bei der IBM festgestellt werden.

Die Bemühungen, den geplanten Versuchsablauf durchzuführen, waren leider nicht erfolgreich. Im Folgenden werden nun die Methoden und Materialien geschildert, mit denen versucht wurde die RNA in der geforderten Quantität und Qualität für das Sequenzieren zu gewinnen.

2.2.2 Gewebeproben und Färbungen

Es wurden Biopsien von bekannten IBM-Patienten genutzt, bei denen im Rahmen der Diagnostik eine Muskelbiopsie entnommen und in Zusammenschau der Befunde eindeutig eine IBM diagnostiziert wurde. Teilweise wurden auch Biopsien von Patienten anderer Myositis-Formen (Polymyositis, Nekrotisierende Myopathie, Dermatomyositis) verwendet, da es aufgrund der Seltenheit der Einschlusskörpermyositis nur wenige IBM-Biopsien verfügbar sind. Die Biopsien wurden für mehrere Jahre in der Neuropathologie der UMG bei -120°C gelagert.

Die Biopsien der anderen Myositis-Formen wurden mit MHC I und *neural cell adhesion molecule* (NCAM) gefärbt. Diese Färbungen zeigen bei den drei Myositiden ein ähnliches Farbe-Ergebnis wie bei einer IBM, daher können sie äquivalent verwendet werden. In einem Fall wurde eine Biopsie eines Patienten mit Nekrotisierender Myopathie mit der α BCrystallin-Färbung gefärbt. Hierbei wurden als Zielstruktur atrophe Fasern gewählt.

2.2.2.1 α BCrystallin-Färbung für die Laser-Mikrodissektion

Für die α BCrystallin-Färbung wurde ein Protokoll entwickelt, das möglichst kurze Inkubationszeiten hatte, um die Degradation der RNA bestmöglich zu verhindern und dennoch ein gutes Anfärben zu gewährleisten. Die Biopsien wurden am Kryostaten geschnitten, die Querschnitte auf die Membran-Objektträger aufgezogen und anschließend bei -80°C gelagert, bevor die Schnitte gefärbt wurden. Für eine möglichst geringe RNase-Aktivität wurden die Membran-Objektträger zunächst für 5 Minuten in eine Küvette mit RNaseZAP gestellt und anschließend zweimal für 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Dann wurden die Schnitte 10 Minuten in PFA fixiert und anschließend dreimal jeweils 3 Minuten in PBS gewaschen. Es folgte das Blocken mit 10 % BSA/Goat (1:1) für 45 Minuten. Ab dem Blocken wurden die folgenden Schritte unter möglichst geringer Lichteinstrahlung durchgeführt und ein Austrocknen der Schnitte mit Färbekammern verhindert. Der gegen α BCrystallin gerichtete Erstantikörper wurde 1:500 in 1 % BSA in PBS auf die Schnitte gegeben und eine Stunde inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen in PBS, dann wurde für 45 Minuten Inkubationszeit der Sekundärantikörper IgG *goat-anti-mouse* Alexa 594 1:600 in 1 % BSA/PBS auf die Biopsien gegeben. Erneut wurden die Schnitte dreimal hintereinander

in PBS gewaschen, dann 5 Minuten DAPI als Kernfärbung auf die Gewebe gegeben. Abschließend wurde wieder dreifach in PBS gewaschen, die Objektträger kurz in Isopropanol gestellt, unter dem Abzug kurz getrocknet und schnellstmöglich mittels Laser-Mikrodissektion weiterverarbeitet.

2.2.2.2 α BCrystallin-Kurzprotokoll für die Laser-Mikrodissektion

Zudem wurde in Anlehnung an die Protokolle anderer Arbeitsgruppen versucht, ein Kurzprotokoll mit deutlich höheren Antikörperkonzentrationen zu entwickeln, das nur 22 Minuten dauerte. Der Objektträger mit dem Schnitt einer IBM-Biopsie wurde erst 30 Sekunden in Smearfix (Ethanol, Trichloressigsäure, Aceton) getaucht. Anschließend wurde der Objektträger kurz mit 50 %igem Ethanol und nachfolgend mit destilliertem Wasser behandelt. Es folgte der gegen α BCrystallin gerichtete Erstantikörper 1:5 in PBS bei 37°C, der für 10 Minuten auf den Schnitt gegeben wurde. Nach kurzem Waschen in PBS folgte Lösung A des REAL EnVision Detection Systems, die für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubierte, wiederholtes Waschen in PBS und dann Lösung B und C 1:50 für 3 Minuten bei Raumtemperatur. Erneutes Waschen in PBS, kurzes Inkubieren mit Hämalun und Spülen mit Leitungswasser schlossen das Kurzprotokoll ab. Bei dem Kurzprotokoll war das Signal von α BCrystallin-positiven Muskelfasern zu schwach, um es für die LMD zu nutzen.

Neben der α BCrystallin-Färbung wurden auch weitere Färbungen durchgeführt, um festzustellen ob es abhängig von der Färbung Unterschiede in der RNA-Ausbeute und -Reinheit gibt. Weitere Färbungen, die genutzt wurden, waren eine α BCrystallin-Durchlicht-Färbung mit Alkalischer Phosphatase und Neufuchsin, eine MHC I-Durchlichtfärbung mit Diaminobenzidin (DAB), Fluoreszenzfärbungen für MHC I, NCAM und auch native Schnitte.

2.2.3 Laser-Mikrodissektion

Die Laser-Mikrodissektion ist ein Verfahren, das es mithilfe eines fokussierten Laserstrahls ermöglicht, Zielstrukturen aus Geweben herauszuschneiden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Gerät von Molecular Machines & Industries (MMI) mit der Bezeichnung MMI CellCut Plus genutzt. Bei diesem System liegt der Schnitt zwischen der Polyethylenterephthalat(PET)-Membran eines speziellen Objektträgers und einem Glas-Objektträger. Anschließend wird die Zielstruktur mit einem UV-Laser ausgeschnitten. Mithilfe eines beschichteten Deckels kann im Anschluss die ausgeschnittene Membran mit dem Zielgewebe aus dem Schnitt gehoben werden. Bei diesem Verfahren, der sog. *CapLift technology* haftet die Zielstruktur inklusive Membran an dem adhäsiven Deckel des Reaktionsröhrchens, siehe Abbildung 2.

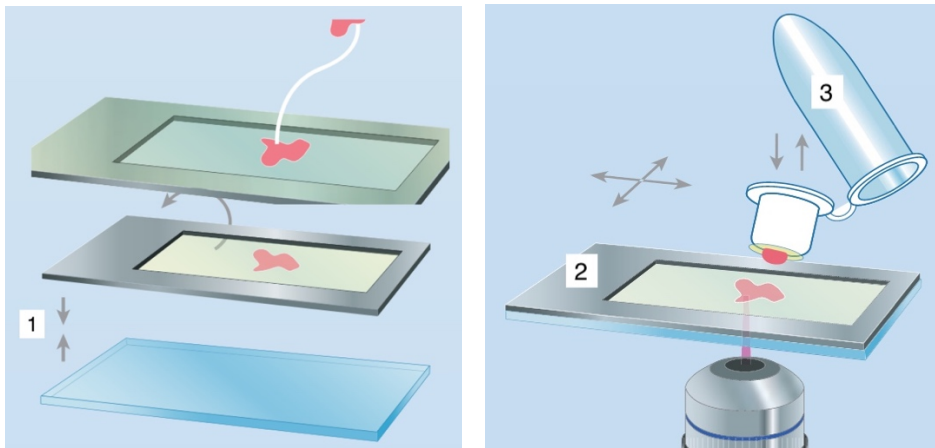


Abbildung 2: Ablauf der Laser-Mikrodissektion.

Das Gewebe wird auf der Membran des Objektträgers positioniert. Der Membran-Objektträger wird umgedreht und auf einen Glas-Objektträger gelegt (1), sodass der Schnitt sich zwischen den beiden Objektträgern befindet (2). Mithilfe des Lasers wird die Zielstruktur ausgeschnitten. Der adhäsive Deckel des Reaktionsröhrchens kann nach unten bewegt werden; die ausgeschnittene Zielstruktur haftet am Deckel und wird so aus dem Gewebe herausgehoben (aus der Broschüre MMI Molecular Machines & Industries Single Cell Solutions mit freundlicher Genehmigung von MMI Molecular Machines & Industries).

Anschließend wird Lysis-Puffer direkt in das Reaktionsgefäß gegeben, der Deckel geschlossen und das Röhrchen während der Inkubationszeit umgedreht hingestellt. Eine andere Möglichkeit ist es, das Reaktionsgefäß zunächst auf Trockeneis zu lagern und zu einem späteren Zeitpunkt die Zellen im Lysis-Puffer zu suspendieren. Anschließend kann beispielsweise eine RNA-Extraktion erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels LMD verschiedene Zielstrukturen aus den Muskelbiopsien von IBM-Patienten ausgeschnitten. In verschiedenen Versuchen wurden sowohl einzelne Zellen als auch Zellverbände und größere Areale isoliert. Da die Qualität und Quantität der RNA davon abhängen, wie lange sich das Gewebe ungekühlt auf dem Objektträger bzw. auf dem adhäsiven Cap befindet, wurde versucht, die Zeiten zwischen Fertigstellung der Färbung und dem Lysis-Puffer bzw. der Lagerung des Reaktionsgefäßes auf Trockeneis möglichst kurz zu halten. Da das Ausschneiden einzelner Zellen sehr zeitaufwändig ist, wurden somit verschiedene Möglichkeiten ausprobiert, um möglichst viel Gewebe in kürzester Zeit zu isolieren:

- Die Schnittdicke wurde variiert (10 μm , 20 μm , 30 μm)
- Es wurden verschieden viele Muskelfasern ausgeschnitten (50-200 Zellen)
- Es wurden entweder einzelne Muskelfasern der gewünschten Zielstruktur oder Muskelfaserverbände oder größere Areale, welche vorwiegend die Zielstruktur enthielten, ausgeschnitten

Auch nach dem Schneiden wurden verschiedene Methoden ausprobiert, um einen guten Übergang vom LMD-Schritt zur Gewinnung der RNA zu ermöglichen. Entweder wurde sofort Lysis-Puffer in das Reaktionsgefäß gegeben, das Gefäß auf den Kopf gestellt und mit

dem RNA-Protokoll fortgefahren oder das Reaktionsgefäß wurde auf Trockeneis gelagert und erst kurz darauf mit der RNA-Extraktion begonnen.

2.2.4 RNA-Extraktion

Für die miRNA-Sequenzierung wurden folgende Grenzwerte für die RNA festgelegt, siehe Tabelle 11.

Tabelle 11: Grenzwerte der RNA-Quantität und -Qualität für die miRNA-Sequenzierung.

	Grenzwerte
RNA-Quantität	3 µl mit 33,3 ng/µl
RNA-Qualität	A260/280: 1,9-2,1
	A260/230: > 1,3

Die Absorptionsmessungen mithilfe eines Spektralphotometers dienen der Bestimmung der Reinheit der RNA. Ein Verhältnis von A260/280 von ca. 2,0 wird als reine RNA angesehen; ein Verhältnis von A260/230 unter 1,3 zeigt eine kontaminierte, d. h. nicht reine RNA, an. Bei Erreichen der Grenzwerte für A260/280 und A260/230 ist auch mit einem guten Ergebnis im Bioanalyzer für die RNA-Integrität (*RNA integrity number*, RIN) zu rechnen. Da der RIN-Wert als Qualitätsmessung der RNA genutzt wird, kann anhand der Absorptionsmessungen ebenfalls die RNA-Qualität vermutet werden. Da die RNA-Qualität nicht im Zielbereich lag und auch die RNA-Quantität nicht zuverlässig ausreichend war, wurden zwei verschiedene Kits (Qiagen und Zymo Research) verwendet, bei denen sich allerdings kein wesentlicher Unterschied zeigte.

Nach der Laser-Mikrodissektion wurde zunächst in das Reaktionsgefäß Trizol als Lysis-Puffer hinzugegeben und für 30 min inkubiert. Um die Proben optimal für die RNA-Extraktion vorzubereiten, wurde die Suspension aus Trizol und dem ausgeschnittenen Gewebe in ein Homogenisator-Röhrchen überführt. Die Homogenisator-Röhrchen enthalten spezielle Keramikperlen, die durch zyklische Vibrationsphasen einen optimalen Aufschluss der Zellen gewährleisten; im vorliegenden Versuch wurde für diesen Schritt ein Precellys 24 Homogenisator von Bertin genutzt. Die RNA-Extraktion wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt, jeweils entsprechend des Kits von Qiagen bzw. Zymo Research.

Anschließend wurde die RNA-Konzentration und -Reinheit mithilfe eines NanoDrop Spektralphotometers bestimmt.

2.2.5 Versuchsablauf mit frischem Muskelgewebe

Um einen Vergleich mit Material von höherer Qualität zu haben, wurden Versuche mit frischem Muskelgewebe durchgeführt. Hierfür wurde Muskelgewebe verwendet, das jungen,

neuromuskulär unauffälligen Patienten im Zuge von elektiven Knie-Operationen (z. B. Kreuzbandplastik) entnommen und sonst verworfen worden wäre. Das Aktenzeichen des entsprechenden Ethikantrags ist AZ 5/2/16. Die adulten Probanden erhielten einen Fragebogen, wurden ausführlich aufgeklärt und gaben ihre Einwilligung zu der Studie. Für den Schutz der Daten wurden die Proben fortlaufend nummeriert und kodiert. Das Buch, in dem der pseudonymisierte Code, der Patientennamen, das Geburtsdatum und das Datum der Probenentnahme festgehalten sind, wird verschlossen aufbewahrt und ist nur berechtigten Personen der AG Schmidt zugänglich.

Das Muskelgewebe wurde bei -80°C gelagert, anschließend am Kryostaten in Schnitte mit $20\ \mu\text{m}$ Schnittdicke geschnitten und auf MMI-MembranSlides aufgezogen. Die Schnitte wurden mit einer konventionellen H.E.-Färbung oder einer zweifachen Fasertypenfärbung gefärbt. Die Fasertypen-Immunfluoreszenz-Färbung wurde mithilfe eines etablierten Standardprotokolls angefertigt. Es folgte die Laser-Mikrodissektion. Hierbei wurden größere Areale ausgeschnitten anstelle von einzelnen Muskelfasern, da es im physiologischen Muskelgewebe keine spezifischen Muskelfasern als Zielstrukturen gab. Nach der Laser-Mikrodissektion wurden die Reaktionsgefäße mit den ausgeschnittenen Muskelfasern auf Trockeneis gelagert, bevor die RNA-Extraktion erfolgte, da bei sofortiger Zugabe von Trizol eine geringere RNA-Ausbeute resultierte.

2.3 Einzelfaser-Analyse

2.3.1 Patientenkollektiv, Geräte und Übersicht der Färbungen

Für die Analyse der Einzelfasern wurden Muskelbiopsien von $n = 4$ IBM-Patienten (davon zwei männliche und zwei weibliche Patienten) und eine Kontrolle verwendet. Bei der Kontrolle handelt es sich um eine Biopsie, in der die Neuropathologie der UMG histologisch keine Muskelerkrankung nachweisen konnte.

Es wurden folgende Färbungen angefertigt: H.E., Trichrom, COX/SDH, TOM20/MHC I, $\alpha\text{BCrystallin/p62}$, iNOS/6E10. Bei den Färbungen H.E., Trichrom und COX/SDH handelt es sich um Durchlichtfärbungen, bei den anderen drei Färbungen um Fluoreszenz-Doppelfärbungen.

2.3.2 H.E.-Färbung

Die H.E.-Färbung ist ein Färbeverfahren, das insbesondere einer Übersichtsdarstellung des Gewebes dient. Die zwei wichtigsten Bestandteile sind Hämatoxylin und Eosin. Hämatoxylin färbt saure, d. h. basophile Strukturen wie den Zellkern mit der enthaltenen DNA und das raue Endoplasmatische Retikulum blau. Eosin hingegen färbt basische, d. h. azidophile Strukturen wie Mitochondrien, Proteine des Zytoplasmas und Kollagen rot an.

Bei IBM-Patienten kann man sogenannte *rimmed vacuoles* in der H.E.-Färbung finden. Dabei handelt es sich um unregelmäßige intrazytoplasmatische Vakuolen mit einem basophil gefärbten Randsaum (Berlit 2012).

Die bei -20°C gefrorenen Schnitte wurden 10 Minuten aufgetaut, getrocknet und für 30 Sekunden mit Smearfix fixiert. Anschließend wurden die Objektträger kurzzeitig in 50 % Ethanol und dann kurz in destilliertes Wasser gedippt. Es folgte eine einminütige Inkubation in Mayers Hämalaun. Die Schnitte wurden dann zum Bläuen 30 Sekunden unter fließendes Leitungswasser gehalten. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 30 Sekunden in 0,1 % Eosin-Lösung gestellt. Nach kurzem Eintauchen in destilliertem Wasser folgte die aufsteigende Alkoholreihe mit 70 % Ethanol, dann 90 % Ethanol und anschließend zweimalig 100 % Ethanol, jeweils für 30 Sekunden. Nach kurzem Eintauchen in Ethanol/Xylol (1:1) wurden die Schnitte zweimal für 30 Sekunden in Xylol gestellt und abschließend mit Entellan eingebettet.

2.3.3 Trichrom-Gomori-Färbung

Die Trichrom-Gomori-Färbung ist ebenfalls eine histologische Übersichtsfärbung. Generell färben sich in der Trichrom-Färbung nach Gomori Zellkerne blaugrün, Muskelfasern grün und Bindegewebe hellgrün, Mitochondrien hingegen erscheinen rot.

Im Gewebe von IBM-Patienten kann man in der Trichrom-Gomori-Färbung charakteristische *red-ragged-fibers* als Zeichen mitochondrialer Veränderungen finden (Rifai et al. 1995). Diese Fasern zeigen unter der Zellmembran eine verstärkte fuchsinophile Anfärbung (Berlit 2012).

Die bei -20°C gelagerten Schnitte wurden 10 bis 20 Minuten aufgetaut und getrocknet. Es folgte eine Inkubation mit Mayers Hämalaun für 3 Minuten und anschließendem Bläuen mit fließendem Leitungswasser für 10 Minuten. Die Schnitte wurden daraufhin zweimal in sterilem, pyrogenfreiem Ampuwa-Wasser gespült. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit der Gomori-Lösung (aus Chromotrop R2, Fast Green/Lichtgrün, Wolframtosphorsäure und Essigsäure) für 15 Minuten inkubiert und dann zum Spülen in Ampuwa-Wasser geschwenkt. Die Fixierung erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 90 % Ethanol, 100 % Ethanol), anschließend Isopropanol/Xylol (1:1) und dreimal für jeweils 3 Minuten lang Xylol. Die Schnitte wurden anschließend mit DePeX eingebettet.

2.3.4 COX/SDH-Färbung

Mit der Cytochrom-c-Oxidase/Succinat-Dehydrogenase-Doppelfärbung können COX-negative Fasern dargestellt werden. Die Färbung dient als Nachweis von mitochondrialen Veränderungen und stellt eine wichtige Methode in der histopathologischen Diagnostik der IBM dar.

COX-positive Fasern färben sich braun an, SDH-positive Fasern erscheinen blau. Die COX/SDH-Doppelfärbung ist geeignet, um die COX-Defizienz und somit mitochondriale Veränderungen möglichst gut immunhistochemisch darzustellen: Wenn eine Muskelzelle die braune COX-Anfärbbarkeit wegen verminderter oder fehlender Funktion der COX verliert, dann wird die blaue SDH-Färbung sichtbar. COX-defiziente Muskelfasern erscheinen somit in der Doppelfärbung blau.

Die bei -20°C gelagerten Präparate wurden 10 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Anschließend folgte die erste Inkubation mit der Inkubationslösung COX aus DAB-Lösung (Phosphatpuffer pH 7,4 und DAB), Cytochrom-Lösung (Phosphatpuffer pH 7,4, Sucrose und Cytochrom C) und Catalase-Lösung (Phosphatpuffer pH 7,4 und Catalase-Lösung) bei $+37^{\circ}\text{C}$ für 1 bis 2 Stunden. Die Inkubation muss regelmäßig kontrolliert werden, da die notwendige Inkubationszeit stark variiert und möglicherweise bis über 2 Stunden betragen kann. Danach folgte dreimaliges Waschen der Schnitte in destilliertem Wasser. Im Anschluss wurden die Schnitte mit der SDH-Inkubationslösung aus Natriumsuccinat, Aqua bidest., Phosphatpuffer pH 7,4 und NBT-Lösung (Nitrotetrazoliumbluechloride NBT und 70 % Dimethylformamid) bei 37°C eine Stunde inkubiert. Da auch diese Färbung mitunter mehr Zeit benötigt, musste sie ebenfalls regelmäßig kontrolliert werden. Nach erneutem dreimaligem Waschen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit DePeX eingebettet.

2.3.5 Immunhistochemie

Bei den drei Doppelfärbungen TOM20/MHC I, α BCrystallin/p62 und iNOS/6E10 wurden Antikörper-basierte Fluoreszenzfärbungen durchgeführt. Da sich die Abläufe ähneln, wird hier die allgemeine Methodik beschrieben. In den nächsten Abschnitten folgen dann die Erläuterungen der einzelnen Färbungen.

Die Schnitte wurden zunächst für 10 Minuten aufgetaut und fixiert, dann folgte das Blocken mit 5 % BSA/PBS oder 5 % *normal goat serum* (NGS)/PBS oder 10 % BSA/NGS. Ab dem Blocken wurden die Schnitte für die folgenden Schritte bis zur Einbettung möglichst wenig Lichteinstrahlung ausgesetzt. Zudem wurde eine feuchte Kammer verwendet, d. h. eine abgedunkelte Färbekammer, die mit feuchten Papiertüchern ausgelegt war.

Das Waschen in PBS wurde stets wie folgt durchgeführt: Die Schnitte wurden dreimal für jeweils 3 Minuten in PBS gestellt und vorsichtig darin geschwenkt. Zwischen den drei Waschschrritten wurde jedes Mal das PBS erneuert.

Bei den drei Doppelfärbungen wurde jeweils zusätzlich eine DAPI-Färbung angefertigt. Durch Inkubation mit DAPI können die Zellkerne angefärbt und somit im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Die fertig gefärbten Schnitte wurden mit Fluoromount eingebettet und lichtgeschützt bei $+4^{\circ}\text{C}$ bis zur Anfertigung der mikroskopischen Aufnahmen gelagert.

2.3.6 TOM20/MHC I

Die Fixierung der TOM20/MHC I-Fluoreszenz-Doppelfärbung erfolgte mit 4 % PFA für 5 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte weitere 5 Minuten in 0,05 % TritonX100 (in PBS) gestellt, ehe sie 30 Minuten lang mit 5 % BSA/PBS geblockt wurden. Nach dem Blocken wurde TOM20 als Erstantikörper 1:100 in 5 % BSA/PBS auf die Muskelschnitte gegeben und 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal jeweils für 3 Minuten in PBS gewaschen (s. o.). Die Schnitte wurden dann 5 Minuten mit 5 % BSA/PBS geblockt. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper IgG *goat-anti-rabbit* Alexa 594 1:200 in BSA/PBS für eine Dauer von 45 Minuten.

Nach erneutem Waschen in PBS (s. o.) schloss sich nun direkt die MHC I-Färbung an. Die Objektträger wurden erneut für 30 Minuten mit 5 % BSA/PBS geblockt, ehe der Primärantikörper MHC I 1:200 in BSA/PBS für 60 Minuten auf die Gewebeproben gegeben wurde. Es folgte wieder das Waschen in PBS (s. o.). Dann wurden die Schnitte 45 Minuten lang mit dem IgG-Zweitantikörper *goat-anti-rat* Alexa 488 inkubiert, wobei der Zweitantikörper 1:600 in BSA/PBS verdünnt war. Die Objektträger wurden dreimal in PBS gewaschen, ehe für 3 Minuten DAPI auf die Schnitte gegeben wurde.

Nach einem letzten PBS-Waschschritt (s. o.) wurden die Schnitte mit Fluoromount eingebettet.

2.3.7 p62/ α BCrystallin

Für die p62/ α BCrystallin-Fluoreszenz-Doppelfärbung wurden die bei -20°C gelagerten Schnitte 10 Minuten lang aufgetaut. Dann folgte ein dreiminütiges Waschen in PBS. Anschließend folgte das Blocken mit 5 % NGS in PBS für eine Stunde. Der gegen α BCrystallin gerichtete Primärantikörper wurde 1:200 in 0,03 % Triton/PBS gegeben, auf die Schnitte aufgetragen und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimalig für 3 Minuten in PBS gewaschen (s. o.), ehe der Zweitantikörper IgG *goat-anti-mouse* Cy3 1:200 in 1 % BSA/PBS für 2 Stunden Inkubationszeit auf die Muskelgewebeproben gegeben wurde. Es folgte erneutes Waschen in PBS (s. o.) und der gegen p62 gerichtete zweite Primärantikörper 1:200 in 0,03 % Triton/PBS, der ebenfalls über Nacht auf den Schnitten blieb. Wieder wurden die Objektträger dreimalig für 3 Minuten in PBS gewaschen (s. o.) und der IgG-Zweitantikörper *goat-anti-mouse* Alexa 488 1:200 in 1 % BSA/PBS für 2 Stunden auf die Schnitte gegeben. Erneut wurden die Schnitte in PBS gewaschen (s. o.), dann erhielten die Präparate eine Kernfärbung mit DAPI für 3 Minuten. Nach einem letzten Waschen in PBS (s. o.) wurden die Schnitte mit Fluoromount eingebettet.

2.3.8 iNOS/ β -Amyloid

Der verwendete Antikörper des Herstellers BioLegend (ehemals Covance) reagiert laut Produktinformation auf die Aminosäurereste 1-16 von β -Amyloid, wobei das Epitop auf den

Aminosäuren 3-8 liegt. Obwohl der Antikörper die Aminosäuren 3-8 als Zielstruktur hat, bindet er trotzdem APP und β -Amyloid. Da die Expression der iNOS und die β -Amyloid-Akkumulation bei IBM miteinander zusammenhängen (Schmidt et al. 2012), wurde eine Doppelfärbung durchgeführt.

Die gefrorenen Schnitte wurden 10 Minuten aufgetaut, ehe sie einmal mit PBS gewaschen wurden. Es folgte die Fixierung mit 4 % PFA für 10 Minuten, dreimaliges Waschen für je 3 Minuten in PBS (s. o.) und 10 Minuten in Methanol. Hierfür wurde -20°C kaltes Methanol in eine Küvette gegeben, die Schnitte in die Küvette hineingestellt und für die 10-minütige Fixierungszeit in einen -20°C kalten Gefrierschrank gelagert. Nach kurzem Abdampfen bei Raumtemperatur wurden die Präparate für 30 Minuten mit 10 % BSA/NGS (1:1) geblockt. Nach erneutem Waschen in PBS (s. o.) wurde der gegen iNOS gerichtete Primärantikörper 1:500 in 1 % BSA/PBS für 24 Stunden inkubiert. Es folgte wieder dreimaliges PBS-Waschen (s. o.), ehe der IgG-Zweitantikörper *goat-anti-rabbit* Alexa 594 1:200 in 1 % BSA/PBS für 2 Stunden Inkubationszeit auf die Schnitte gegeben wurde.

Nach weiterem dreimaligem Waschen in PBS (s. o.) erfolgte die zweite Färbung der Fluoreszenz-Doppelfärbung. Hierfür wurden die Schnitte mit dem gegen 6E10 gerichteten Erstantikörper 1:50 in 1 % BSA/PBS 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger wieder mit PBS gewaschen (s. o.). Dann wurde für 2 Stunden Inkubationszeit der Sekundärantikörper IgG *goat-anti-mouse* Alexa 488 1:200 in 1 % BSA/PBS auf die Muskelschnitte gegeben.

Nun folgte nochmaliges Waschen in PBS (s. o.), 45 Sekunden DAPI für die Kernfärbung, erneutes PBS-Waschen (s. o.) und mittels Fluoromount wurden die Schnitte eingebettet.

2.3.9 Auswertung

Von den Schnitten wurden an einem Olympus VS-120 Scanner-Mikroskop Aufnahmen angefertigt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software cellSens von Olympus.

Für die quantitative Auswertung wurden in den Fluoreszenzdoppelfärbungen α BCrystallin/p62, TOM20/MHC I und iNOS/6E10 einerseits alle Muskelfaserquerschnitte des Schnitts und andererseits die Anzahl der positiven Fasern der jeweiligen Färbung gezählt. Daraus wurde dann ein prozentualer Anteil der positiven Muskelfasern an der Gesamtzahl der Muskelfaserquerschnitte berechnet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass Artefakte, die positiv angefärbt erschienen nicht mitgezählt wurden, beispielsweise ein zu starkes Hintergrundsignal, ein intensiveres Anfärben am Rand des Schnittes o. ä.

In der qualitativen Auswertung wurde von einer Zielstruktur (= α BCrystallin-positive bzw. -negative Muskelfaser) ausgehend eine longitudinale Analyse von Einzelfasern angefertigt. Es konnte somit für dieselbe Muskelfaser im longitudinalen Verlauf analysiert werden, wie sie sich in den verschiedenen Färbungen der Serienschnitte verhält.

Bei der Zielstruktur α BCrystallin-Positivität wurde wie folgt vorgegangen: Es wurde ein α BCrystallin-positiv angefärbter Muskelfaserquerschnitt identifiziert. Diese Muskelfaser wurde in allen drei Fluoreszenz-Doppelfärbungen ermittelt. Nun wurde das Färbeverhalten dieser identischen Muskelfaser dokumentiert, d. h. für jede Fluoreszenzfärbung und die COX-Färbung wurde einzeln betrachtet, ob die Muskelfaser positiv oder negativ angefärbt ist. Zudem wurde der Querschnitt der Muskelfaser gemessen.

Bezüglich der Zielstruktur α BCrystallin-Negativität war der Ablauf folgender: Als Zielstruktur wurden α BCrystallin-negative Muskelfaserquerschnitte analysiert. Da der Großteil der Muskelfasern in den Schnitten α BCrystallin-negativ waren, wurden Muskelfasern gewählt, die in der Nähe von α BCrystallin-positiven Muskelfasern lokalisiert waren. Im Vergleich mit den positiven Fasern konnten die Muskelfasern sicherer als negativ gewertet werden. Auch hierbei wurden die α BCrystallin-negativen Muskelfasern in den verschiedenen Färbungen nachverfolgt und für jede Muskelfaser in jeder Färbung entschieden, ob es sich um ein positives Färbesignal handelte oder nicht. Es erfolgte außerdem eine Bestimmung des Durchmessers der Muskelfaser.

In der Trichrom- und H.E.-Färbung wurde kontrolliert, dass es sich bei den Zielstrukturen tatsächlich um Muskelfasern und nicht um Gefäße o. ä. handelt. Ferner wurde in der H.E.-Färbung die Morphologie der α BCrystallin-positiven Einzelfasern betrachtet. Als pathologische Morphologie wurden hierbei internalisierte Zellkerne, Vakuolen, zerklüftete Muskelfaserränder, Atrophie und Hypertrophie bewertet.

Auf diese Weise wurden in jeder Biopsie 20 α BCrystallin-positive Muskelfasern plus eine Einzelfaser jeweils pro 18 α BCrystallin-positiver Muskelfasern untersucht. Die zusätzliche Analyse von einer weiteren Einzelfaser pro 18 α BCrystallin-positiven Muskelfasern diente dazu, zu berücksichtigen, dass es hohe Unterschiede bezüglich des Anteils an α BCrystallin-positiven Muskelfasern zwischen den vier Biopsien gab. Somit ergab sich für die vier Biopsien die folgende Verteilung der ausgewerteten Einzelfasern:

Biopsie Patient 1 (nachfolgend: Biopsie 1): In diesem Schnitt waren nur $n = 10$ α BCrystallin-positiven Muskelfasern zu detektieren.

Biopsie Patient 2 (nachfolgend: Biopsie 2): Hier wurden für die insgesamt 27 α BCrystallin-positiven Muskelfasern ($27 : 18 = 1,5 \approx 2$) zwei Muskelfasern zusätzlich zu den 20 Muskelfasern ausgewertet, d. h. $n = 22$ für die Einzelfaseranalyse.

Biopsie Patient 3 (nachfolgend: Biopsie 3): Für die 179 α BCrystallin-positiven Muskelfasern wurden ($179 : 18 = 9,9 \approx 10$) zehn Einzelfasern analysiert. Es ergab sich für diese Biopsie somit $n = 20 + 10 = 30$ Einzelfasern.

Biopsie Patient 4 (nachfolgend Biopsie 4): In diesem Schnitt waren 329 Muskelfasern α BCrystallin-positiv angefärbt. Somit wurden zusätzlich zu den 20 Einzelfasern noch 18

weitere ($329 : 18 = 18,3 \approx 18$) α BCrystallin-positiven Muskelfasern longitudinal ausgewertet; so ergibt sich $n = 38$.

Es konnten somit $10 + 22 + 30 + 38 = 100$ α BCrystallin-positiv Muskelfasern analysiert werden. Für die α BCrystallin-negativen Muskelfasern wurde dementsprechend ebenfalls $n = 100$ als Anzahl festgelegt und auch die Verteilung zwischen den Biopsien beibehalten.

Es wurde dann das Färbeverhalten in den einzelnen Färbungen und der Durchmesser der Muskelfaser dokumentiert. Anschließend wurde geprüft, ob es mehrere Muskelfasern gibt, die das gleiche Färbeverhalten haben.

Anhand des Faserdurchmessers (Messverfahren siehe Kapitel 2.1.3.2) wurden die Muskelfasern eingeteilt in normotrophe, atrophe und hypertrophe Muskelfasern. In Tabelle 12 sind die Referenzwerte (Brooke und Engel 1969) für die Einteilung des Muskelfaserquerschnitts in Normotrophie, Atrophie und Hypertrophie geschlechtsspezifisch angegeben.

Tabelle 12: Geschlechtsspezifische Grenzwerte für Normotrophie, Atrophie und Hypertrophie von Muskelfaserquerschnitten

	Frauen	Männer
Normotrophie	30-70 μm	40-80 μm
Atrophie	< 30 μm	< 40 μm
Hypertrophie	≥ 70 μm	≥ 80 μm

Neben dieser Auswertung auf Einzelfaserebene konnte auch eine quantitative Analyse ausgehend von der Zielstruktur erfolgen. Bei der Zielstruktur α BCrystallin-Positivität beispielsweise wurde manuell bestimmt, wie viele der $n = 100$ α BCrystallin-positiven Muskelfasern auch in den jeweils anderen Färbungen positiv angefärbt waren. Hieraus wurde eine Prozentzahl errechnet. Diese gab z. B. an, wie viel Prozent der 100 α BCrystallin-positiven Muskelfasern auch p62-positiv waren. Als zweite Stufe wurde dann von diesem Marker ausgehend, im Beispiel p62, wiederum das Färbeverhalten in den anderen Färbungen untersucht.

2.3.10 Statistik

Für die statistische Auswertung der Einzelfaseranalyse wurde das Programm GraphPad Prism Version 8.3.0 genutzt.

Für die quantitative Auswertung der Einzelfaseranalyse von jeweils $n = 100$ α BCrystallin-positiven und -negativen Einzelfasern wurde eine Korrelationsanalyse mit Spearman'schem Korrelationskoeffizient und $\alpha = 0,05$ angewendet.

Die Einzelfaseranalyse wurde zudem durch das Erstellen von entsprechenden Funktionen in Microsoft Excel Version 16.30 erleichtert. Die graphischen Darstellungen wurden mit GraphPad Prism Version 8.3.0 und als SmartArt-Graphik mit Microsoft Word Version 16.28 erstellt.

3 Ergebnisse

Diese Arbeit verbindet drei verschiedene Herangehensweisen, um die histopathologischen Zellstressparameter bei der IBM zu analysieren. Der Ergebnisteil ist in drei Abschnitte gegliedert, entsprechend der drei verwendeten Methoden. Im ersten Teil werden anhand einer Fallstudie mehrere posthum entnommene Muskelproben eines IBM-Patienten bezüglich ihrer histopathologischen Merkmale verglichen. Anschließend wird im zweiten Teil auf den Versuch eingegangen, α BCrystallin-positive Muskelfasern mittels LMD aus IBM-Biopsien herauszuschneiden, die RNA zu extrahieren um anschließend die miRNA zu sequenzieren. Im dritten Abschnitt werden vier IBM-Patientenbiopsien auf Einzelfaserebene analysiert, um zu sehen, welche Marker zeitgleich in den gleichen Muskelfasern exprimiert sind. Anschließend werden die Ergebnisse der drei Abschnitte miteinander verglichen.

3.1 Fallstudie

3.1.1 Färbungen

Die Muskelproben des IBM-Patienten wurden in den Färbungen H.E., Trichrom, COX-I, CD8⁺, MHC I, C5b-9, α BCrystallin und p62 gefärbt. Beispiele der Färbungen zeigt Abbildung 3.

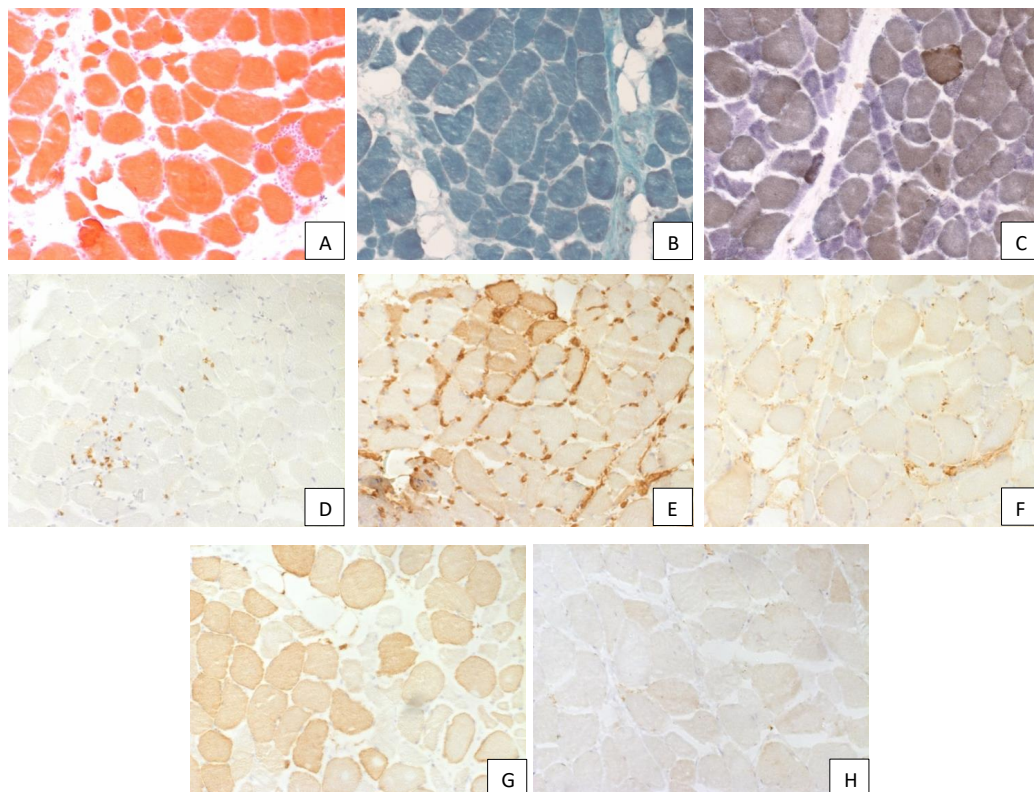


Abbildung 3: Färbungen der Fallstudie in 20-facher Vergrößerung.

A) H.E., B) Trichrom, C) COX-I, D) CD8⁺, E) MHC I, F) C5b-9, G) α BCrystallin, H) p62.

3.1.2 Klinisch betroffene Muskeln

Nachdem die histopathologische Auswertung der Gewebsschnitte beendet wurde, konnte die Verblindung der Schnitte aufgehoben werden. Nun zeigte sich, von welchen Muskeln Proben entnommen wurden. Somit konnten die bei den Ambulanz-Terminen erhobenen Untersuchungsergebnisse der jeweiligen Lokalisation der entnommenen Muskelproben zugeordnet werden. Für jeden Muskel konnte nun anhand der Kraftgrade und Funktionstests entschieden werden, ob der Muskel klinisch betroffen war.

In Tabelle 13 sind die entnommenen Muskeln aufgelistet. Anhand der Untersuchungsergebnisse aus dem Ambulanzbrief der Neuromuskulären Spezialambulanz der UMG (siehe Tabelle 9) wurde erhoben, ob die Muskeln klinisch betroffen waren.

Tabelle 13: Entnommene Muskeln und klinische Affektion.

Muskel	Klinisch betroffen?
rechter M. deltoideus	nein
linker M. biceps brachii	ja
rechter M. biceps brachii	ja
linker M. quadriceps femoris	ja
rechter M. biceps femoris	nein
linker M. biceps femoris	nein
rechter M. extensor digitorum	ja
linker M. extensor digitorum	ja
rechter M. gastrocnemius	nein
linker M. gastrocnemius	nein
zervikale autochthone Rückenmuskulatur	klinisch nicht untersucht
lumbale autochthone Rückenmuskulatur	klinisch nicht untersucht
linker M. flexor digitorum	ja
linker M. tibialis anterior	ja

Diese Auswertungsmethode hat folgende systematische Einschränkungen:

Bei der Erhebung der MRC-Kraftgrade werden nicht nur einzelne Muskeln gezielt untersucht, sondern es findet trotz standardisierter Untersuchungstechnik immer auch eine Innervation benachbarter bzw. synergistisch wirkender Muskelgruppen statt. Vor allem bei der IBM, wo sich die Muskelschwäche über einen sehr langen Zeitraum entwickelt (Benveniste

et al. 2011; Schmidt 2018), können synergistisch wirkende Muskeln die Funktion bereits affektierter Muskeln übernehmen. Somit werden in der Kraftgradmessung oft bessere Ergebnisse erzielt, als bei einer spezifischen Einzeltestung unter Ausschluss synergistisch wirkender Muskeln bzw. Muskelgruppen erreicht werden würde. Der M. gastrocnemius beispielsweise war bei dem Patienten in der klinischen Untersuchung unauffällig (siehe Tabelle 9 und Tabelle 13), ist bei IBM aber häufig betroffen. Die Kompensation der Plantarflexion könnte bei dem Patienten z. B. durch den synergistisch wirkenden M. soleus (die beiden Köpfe des M. gastrocnemius und der M. soleus werden auch als M. triceps surae zusammengefasst) erfolgen, wodurch ein unauffälliges Ergebnis in der Kraftgradmessung vorgetäuscht wird.

In der klinischen Routineuntersuchung werden bestimmte Muskelgruppen nicht standardmäßig getestet. Eine Untersuchung der zervikalen und lumbalen autochthonen Rückenmuskulatur wurde im Ambulanzbrief nicht erwähnt. Eine Schwäche dieser beiden Muskelgruppen kann somit nicht ausgeschlossen werden. Da aber vom Patienten keine diesbezüglichen Defizite berichtet wurden, wird für die Fallstudie davon ausgegangen, dass die autochthone Rückenmuskulatur unauffällig war.

Einige der entnommenen Muskeln haben verschiedene Anteile mit unterschiedlichen Funktionen, beispielsweise hat der M. quadriceps femoris die vier Anteile M. rectus femoris, M. vastus intermedius, M. vastus medialis und M. vastus lateralis. Es wurde aber bei der Entnahme nicht die genaue Lokalisation dokumentiert.

Der letzte vorliegende Ambulanzbrief wurde vier Monate vor dem Tod des Patienten verfasst. Da es sich bei IBM um einen chronisch-progredienten Krankheitsverlauf handelt, ist von einer leichten Verschlechterung der Symptome auszugehen. Da der Prozess der zunehmenden Muskelschwäche aber sehr langsam über viele Jahre abläuft, sind die Untersuchungsergebnisse trotzdem als aktuell genug zu werten, um sie für die Analyse zu nutzen.

Tatsächlich war die Qualität der Schnitte nicht bei allen Proben ausreichend für eine histopathologische Auswertung. Somit wurden die folgenden fünf Muskelproben nicht ausgewertet: linker M. deltoideus, thorakale autochthone Rückenmuskulatur, linker M. tibialis anterior, rechter M. flexor digitorum und eine zweite Probe vom linken M. quadriceps femoris. Auch bei den nicht-auswertbaren Proben wurde erst nach Auswertung aller Muskelproben die Pseudonymisierung aufgehoben.

3.1.3 Quantitative Auswertung

Für die Auswertung der Fallstudie wurden in den Färbungen CD8⁺, MHC I, C5b-9, α BCrystallin und p62 die positiv gefärbten Muskelfasern bzw. bei COX die COX-defizienten Fasern in den vier zufällig gewählten Sichtfeldern erfasst. Diese Zahl wurde dann durch die Anzahl der Muskelfasern in den Sichtfeldern geteilt. So konnte pro Färbung ein prozentualer Wert ermittelt werden, der den durchschnittlichen Anteil an angefärbten Fasern angab. Zudem wurden in der Trichrom-Färbung die *red-rimmed vacuoles* innerhalb dieser vier Sichtfelder

gezählt; bei Vorhandensein von *red-rimmed vacuoles* wurde die Muskelprobe als positiv für *red-rimmed vacuoles* gewertet.

In Abbildung 4 sind die prozentualen Anteile der positiv angefärbten bzw. COX-defizienten Muskelfasern in den einzelnen Muskelproben dargestellt. Mit einem Stern gekennzeichnet sind die Proben, die *red-rimmed vacuoles* in den zufällig ausgewählten Ausschnitten hatten. Außerdem wurde markiert, welche Muskeln auch klinisch betroffen waren (siehe Tabelle 13).

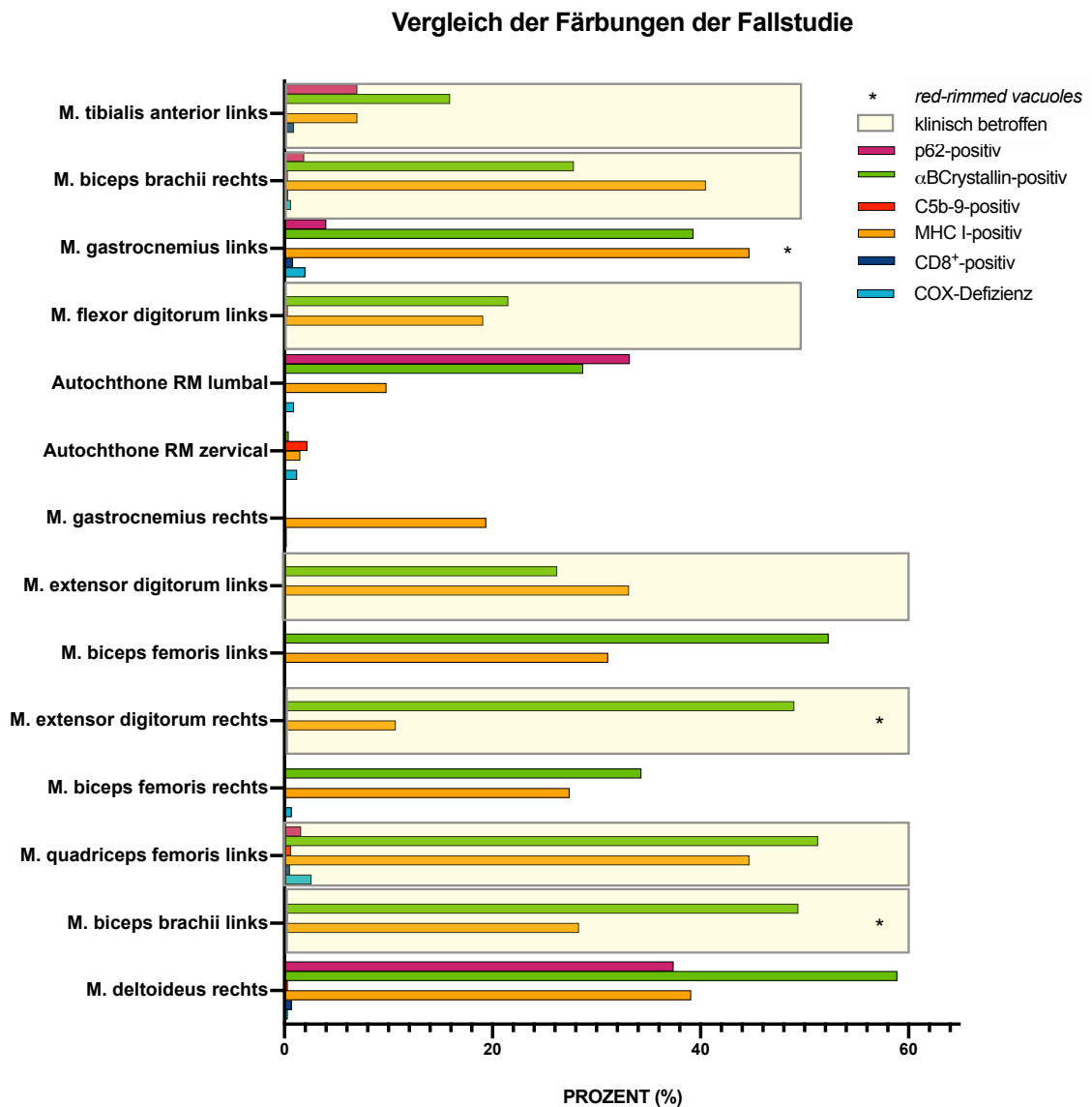


Abbildung 4: Prozentualer Anteil der positiven bzw. COX-defizienten Muskelfasern in den Ausschnitten der verschiedenen Muskelproben.

Auf der y-Achse sind die Muskeln aufgelistet, deren Proben in den Färbungen COX-Defizienz, CD8⁺, MHC I, C5b-9, α BCrystallin und p62 gefärbt wurden. Auf der x-Achse ist der jeweilige Prozentwert der positiven bzw. COX-defizienten Muskelfasern für die einzelnen Färbungen angegeben. Die Muskeln, die klinisch betroffen waren, sind farblich markiert. * = Muskelproben mit *red-rimmed vacuoles* in der Trichrom-Färbung in den untersuchten Ausschnitten. RM = Rückenmuskulatur.

Das Diagramm der Abbildung 4 zeigt, dass es Marker gibt, die mehrmals bei dem Patienten gemeinsam auftreten und miteinander zusammenhängen könnten:

In sechs der 14 Muskelproben konnten in den vier zufällig ausgewählten Sichtfeldern p62-positive Muskelfasern nachgewiesen werden. Diese sechs Proben hatten auch einen Anteil von über 15 % an α BCrystallin-positiven Muskelfasern; drei dieser Muskeln waren in der klinischen Untersuchung unauffällig und drei zeigten eine klinische Beeinträchtigung (siehe Tabelle 13).

Der Zellstress-Marker α BCrystallin konnte in 13 der 14 Muskelproben nachgewiesen werden, davon waren sechs klinisch unauffällig und sieben klinisch beeinträchtigt. Den geringsten prozentualen Anteil an α BCrystallin-positiven Muskelfasern hatte die autochthone Rückenmuskulatur zervikal (0,4 %), den höchsten prozentualen Anteil der M. deltoideus rechts (58,9 %). Einzig im klinisch unauffälligen M. gastrocnemius rechts lagen in den vier zufälligen Sichtfeldern keine α BCrystallin-positiven Muskelfasern.

In drei der Muskelproben waren in den vier zufällig ausgewählten Sichtfeldern *red-rimmed vacuoles* in der Trichrom-Färbung zu finden. In diesen drei Proben (M. biceps brachii links, M. extensor digitorum rechts und M. gastrocnemius links) waren mit jeweils knapp 40 % oder mehr vergleichsweise hohe α BCrystallin-Prozentwerte zu finden. Die ersten beiden genannten Muskel waren klinisch affektiert, der M. gastrocnemius links nicht.

CD8⁺-Zellen waren in sechs Muskelproben nachweisbar (Anteil der Muskelfasern, die CD8⁺-Zellen in ihrer unmittelbaren Umgebung hatten: 0,7 % M. deltoideus rechts, 0,5 % M. quadriceps femoris links, 0,2 % M. gastrocnemius rechts, 0,8 % M. gastrocnemius links, 0,3 % M. biceps brachii rechts, 0,9 % M. tibialis anterior links), davon hatten fünf auch p62-Positivität. Nur eine Probe (M. gastrocnemius rechts) hatte eine CD8⁺-Invasion aber keine p62-positiv angefärbten Muskelfasern. Zudem wies nur eine Probe (autochthone Rückenmuskulatur lumbal) eine p62-Hochregulation in den vier Ausschnitten ohne Vorhandensein von CD8⁺-Zellen auf.

Des Weiteren wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Es wurde hierbei geprüft, ob die Marker miteinander bzw. mit der Klinik (klinisch betroffen/klinisch nicht betroffen) bzw. mit dem Variabilitätskoeffizienten des Faserdurchmessers bzw. dem Atrophie-/Hypertrophiefaktor korrelieren. Die einzige statistisch signifikante Korrelation lag zwischen α BCrystallin und MHC I vor, dargestellt in Abbildung 5.

Korrelation α BCrystallin und MHC I

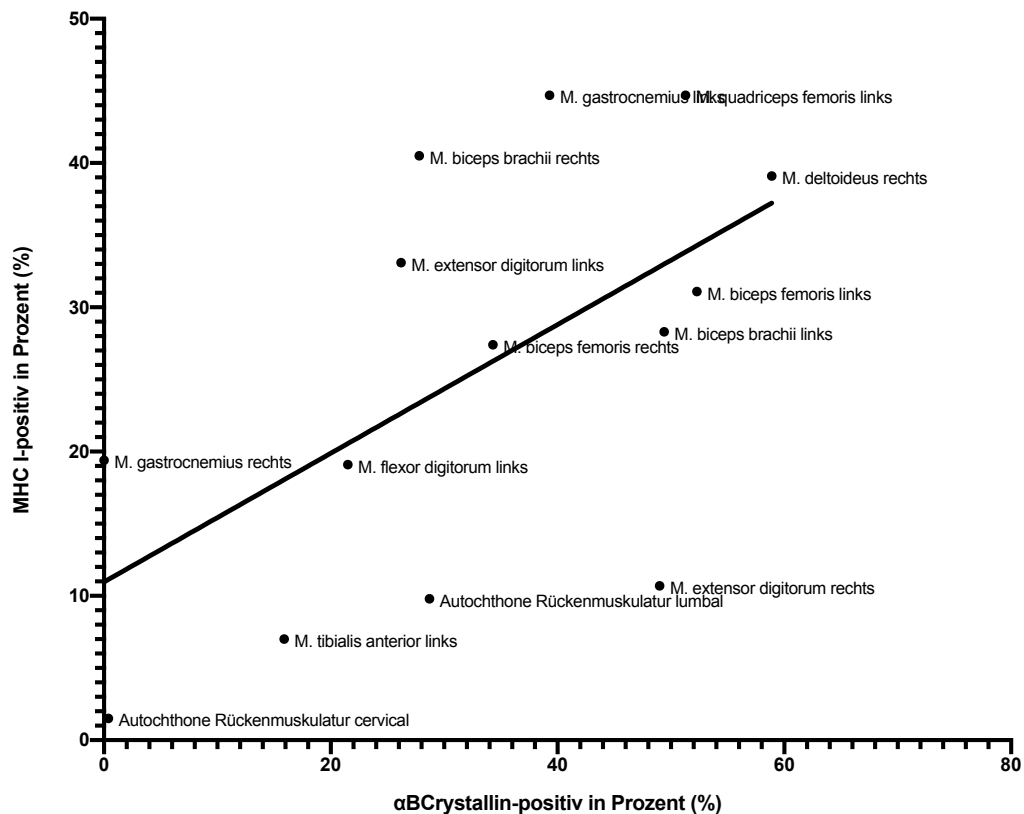


Abbildung 5: Korrelation zwischen den prozentualen Werten für α BCrystallin- und MHC I-positiven Muskelfasern.

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der α BCrystallin-positiven Muskelfasern auf der x-Achse und die MHC I-positiven Muskelfasern auf der y-Achse. Markiert sind die einzelnen Muskeln, aus denen eine Probe entnommen wurde mit dem jeweiligen Prozentwert.

Die Korrelation zwischen α BCrystallin und MHC I war statistisch signifikant mit $p = 0,0291$, $\alpha = 0,05$ und $r = 0,5816$. Der r -Wert zeigt einen positiven Zusammenhang mit guter Korrelation.

3.1.4 Auswertung des Faserdurchmessers

Für die einzelnen Muskelproben wurde jeweils in einem zufällig gewählten Ausschnitt bei allen Muskelfaserquerschnitten der Faserdurchmesser gemessen und der jeweilige Atrophie- und Hypertrophiefaktor bestimmt (siehe Kapitel 2.1.3.2).

In Abbildung 6 sind die Faserdurchmesser der Muskelquerschnitte in den Ausschnitten der jeweiligen Proben als Streudiagramm dargestellt. Diese Art der graphischen Darstellung ermöglicht es, sowohl den Mittelwert der Faserdurchmesser als Balken darzustellen, als auch die Standardabweichung und die einzelnen Werte. Farblich gekennzeichnet sind zudem die klinisch betroffenen Muskeln.

Muskelfaserdurchmesser Fallstudie

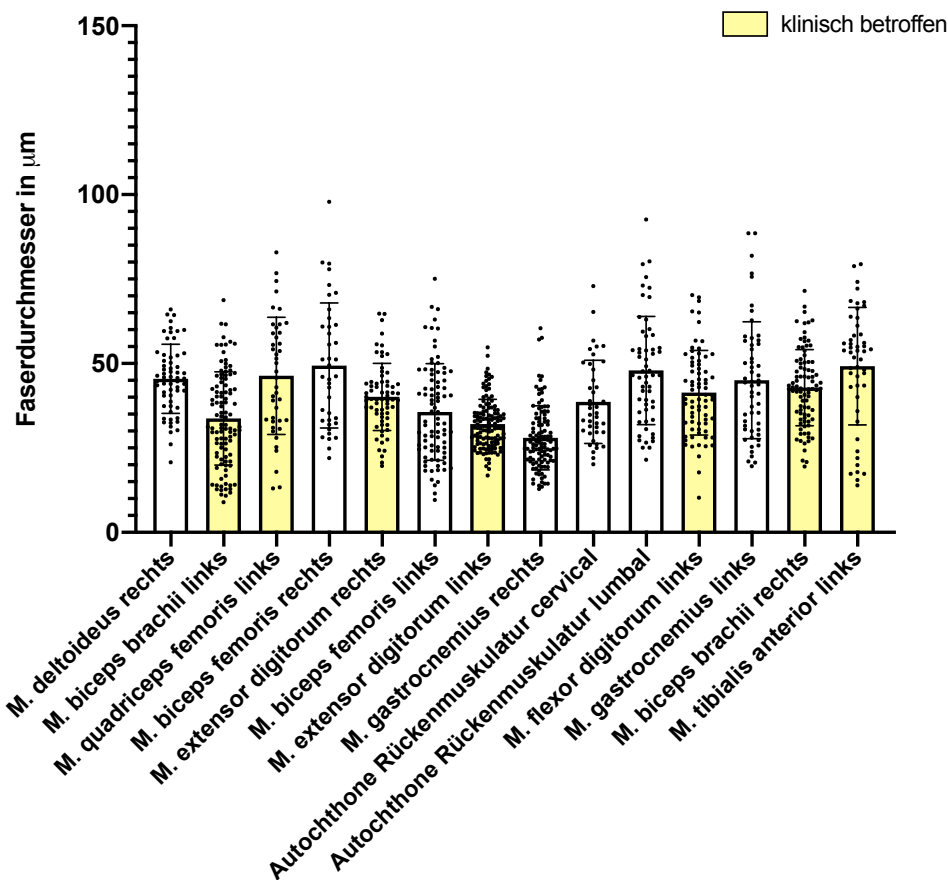


Abbildung 6: Muskelfaserdurchmesser als Streudiagramm dargestellt.

Auf der x-Achse sind die Muskeln aufgelistet, aus denen Proben entnommen wurde; die y-Achse zeigt den Faserdurchmesser in µm. Der Balken kennzeichnet den Mittelwert, des Weiteren sind die Standardabweichung und die Einzelwerte abgebildet. Die gelb gefärbten Balken heben die klinisch betroffenen Muskeln hervor.

Das Diagramm in Abbildung 6 zeigt die Einzelwerte der gemessenen Faserdurchmesser. In einigen Muskeln, beispielsweise dem M. biceps femoris rechts, der autochthonen Rückenmuskulatur und dem M. gastrocnemius links sind die Werte sehr weit gestreut, was ein Zeichen für große Schwankungen im Faserkaliber ist. Doch in der klinischen Untersuchung des Patienten waren die drei Muskeln nicht beeinträchtigt.

Der M. extensor digitorum links hingegen, der in der Untersuchung eine verminderte Muskelkraft hatte, zeigt keine ausgeprägte Streuung. Dafür beträgt bei ihm der Mittelwert der Faserdurchmesser nur 32,1 µm. Da es sich bei Frauen ab einem Wert von unter 30 µm um eine atrophe Muskelfaser handelt (siehe Tabelle 12) ist dieser Mittelwert als sehr gering zu werten. Der niedrigste Mittelwert wurde aber beim M. gastrocnemius rechts (28 µm) bestimmt, der klinisch keine Affektion zeigte.

Es lässt sich aus dem Graphen der Abbildung 6 keine eindeutige Aussage ableiten hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen den Mittelwerten und der Streuung der Faserdurchmesser in Bezug auf die klinische Affektion.

Zudem wurde für jede Probe der Variabilitätskoeffizient der gemessenen Muskelquerschnitte errechnet. Dies zeigt, wie stark die Kaliber der Faserquerschnitte schwanken, wobei eine hohe Variation im Faserkaliber typisch für die Einschlusskörpermyositis ist. In Abbildung 7 sind die Variabilitätskoeffizienten der einzelnen Muskelproben dargestellt und die jeweils klinisch betroffenen Muskeln sind farbig markiert.

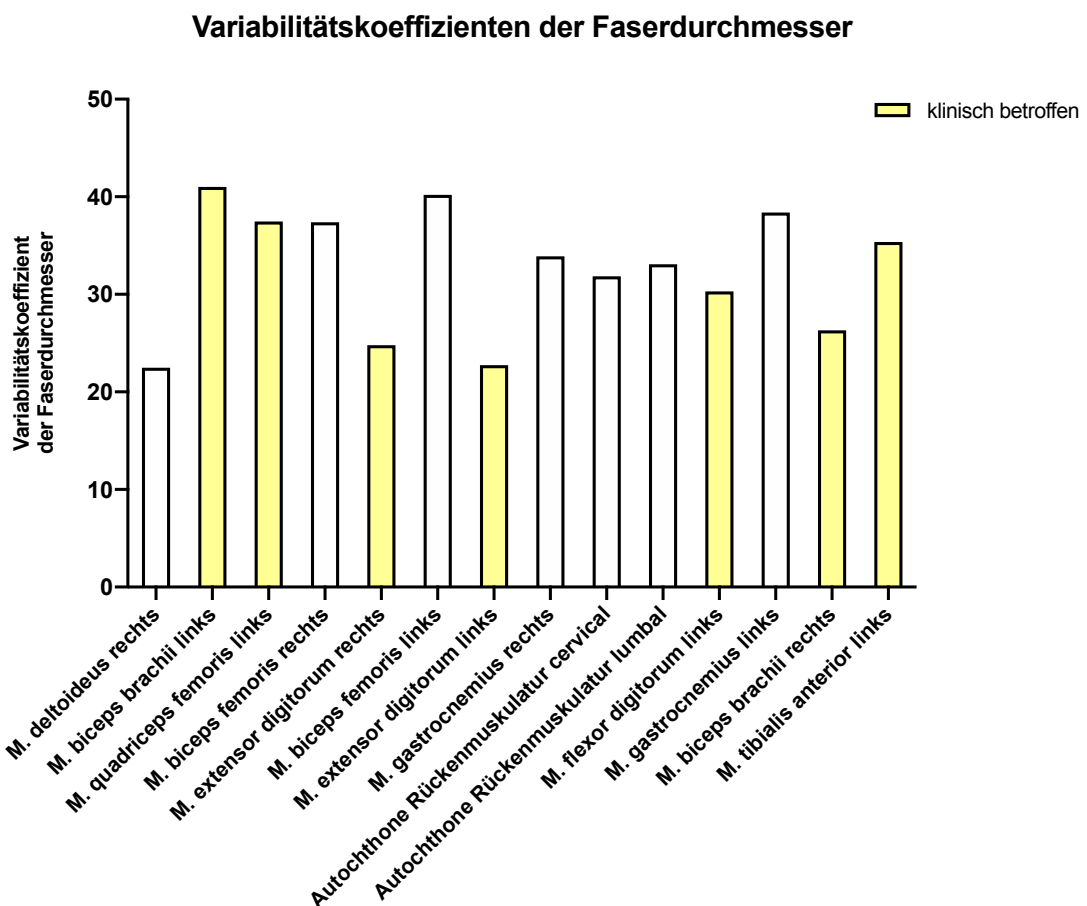


Abbildung 7: Variabilitätskoeffizienten der Muskelfaserdurchmesser in den entnommenen Muskelproben.

Auf der x-Achse sind die Muskeln aufgelistet, auf der y-Achse der jeweilige Variabilitätskoeffizient. Die klinisch betroffenen Muskeln sind farbig markiert.

Der Graph in Abbildung 7 zeigt die Variabilitätskoeffizienten des Faserdurchmessers, d. h. man kann ablesen, wie ausgeprägt die Faserkaliber-Variation in den einzelnen Muskelproben war. Der Variabilitätskoeffizient liegt zwischen rund 22,5 beim M. deltoideus rechts (klinisch nicht betroffen) als niedrigsten Wert bis rund 41 beim M. biceps brachii links (klinisch betroffen) als höchsten Wert. Es lässt sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Faserkaliber-Variation und klinischer Affektion feststellen, da der klinisch betroffene M. extensor

digitorum links mit einem Wert von rund 22,7 nur knapp einen höheren Variabilitätskoeffizient hat als der M. deltoideus rechts mit dem niedrigsten Wert. Der zweithöchste Wert wird vom klinisch nicht affektierten M. biceps femoris links erreicht, der mit 40,2 nur leicht unter dem Höchstwert liegt.

Die klinisch nicht betroffenen Muskeln haben Variabilitätskoeffizienten zwischen 22,5 bis 41 mit einem Mittelwert von 33,9 und die klinisch affektierten Muskeln zeigten in den Proben Werte zwischen 22,7 bis 40,2 mit einem Mittelwert von 31,1. Die Variation des Faserkalibers war demnach, entgegen der Erwartung, bei den klinisch nicht betroffenen Muskeln etwas stärker ausgeprägt als bei den Muskeln, die in der klinischen Untersuchung Auffälligkeiten zeigten. Feststellbar ist aber ein Unterschied zwischen rechter (Mittelwert 29) und linker (Mittelwert 35,1) Körperseite und oberer (Mittelwert 27,9) und unterer Extremität (Mittelwert 37,1).

Des Weiteren wurden aus den gemessenen Faserdurchmessern eines repräsentativen Ausschnitts pro Muskelprobe der Atrophie- und Hypertrophiefaktor (siehe Kapitel 2.1.3.2) errechnet. In Abbildung 8 sind die Werte der Atrophie- und Hypertrophiefaktoren der einzelnen Muskeln dargestellt; die klinisch betroffenen Muskeln sind farbig markiert.

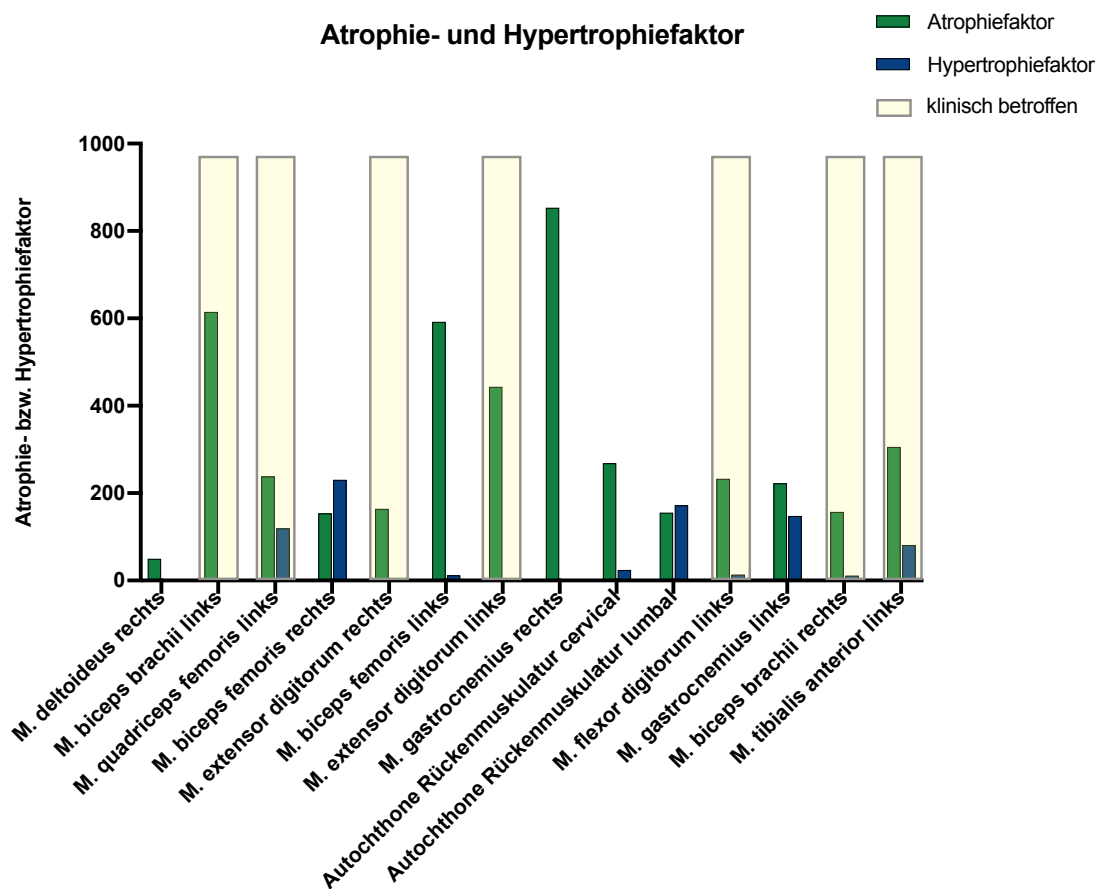


Abbildung 8: Atrophie- und Hypertrophiefaktor der entnommenen Muskelproben.

Auf der x-Achse sind die untersuchten Muskeln aufgelistet, auf der y-Achse ist der errechnete Atrophie- bzw. Hypertrophiefaktor aufgetragen. Die klinisch betroffenen Muskeln sind farbig markiert.

Mithilfe des Graphen der Abbildung 8 kann der Atrophie- und Hypertrophiefaktor der verschiedenen Muskelproben miteinander verglichen werden. Schon auf den ersten Blick fällt auf, dass die Werte für den Atrophiefaktor meistens deutlich höher sind; nur beim *M. biceps femoris* rechts und der autochthonen Rückenmuskulatur sind die Hypertrophiefaktoren leicht höher als die Atrophiefaktoren. Der *M. biceps femoris* rechts war klinisch nicht betroffen, bei der autochthonen Rückenmuskulatur lumbal ist eine klinische Beurteilung schwierig (siehe Kapitel 3.1.2). In neun Fällen konnte ein Hypertrophiefaktor bestimmt werden; der Atrophiefaktor war in allen untersuchten Muskelproben vorhanden.

Den höchsten Atrophiefaktor hat der *M. gastrocnemius* rechts, während er klinisch unauffällig war. Der zweithöchste Wert wurde für den *M. biceps brachii* links bestimmt; dieser zeigte in der klinischen Untersuchung auch eine reduzierte Muskelkraft, siehe Tabelle 13. Sowohl in diesen beiden Muskelproben als auch dem *M. biceps femoris* links und dem *M. extensor digitorum* links war ein sehr hoher Atrophiefaktor von über 400 aber kein bzw. ein sehr niedriger Hypertrophiefaktor nachweisbar. Abbildung 8 zeigt, dass eher die Muskeln mit einem mittleren oder geringen Atrophiefaktor auch einen Hypertrophiefaktor haben. Ein hoher Atrophiefaktor tritt in den untersuchten Proben sowohl bei Muskeln auf, die in der Untersuchung auffällig waren (z. B. *M. biceps brachii* links und *M. extensor digitorum* links), als auch in klinisch nicht betroffenen Muskeln (z. B. *M. gastrocnemius* rechts und *M. biceps femoris* rechts). Auch der Hypertrophiefaktor ist sowohl bei vier klinisch betroffenen als auch bei fünf klinisch nicht betroffenen Muskeln nachweisbar. Es lässt sich aus dem Graphen somit kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Atrophie- bzw. Hypertrophiefaktor und klinischer Affektion ableiten.

Nun wurden die Ergebnisse aus den immunhistochemischen Färbungen und den Faserdurchmessern inkl. Atrophie- und Hypertrophiefaktor jeweils miteinander und mit der Klinik (klinisch betroffener Muskel/ klinisch nicht betroffener Muskel) verglichen. Die gefundenen Auffälligkeiten der Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben.

3.1.5 Atrophie und abnehmende Muskelkraft

Aus den Ergebnissen der klinischen Untersuchung insbesondere mithilfe der MRC-Kraftgrade (siehe Tabelle 9) wurde abgeleitet, welche Muskeln klinisch betroffen waren, siehe Kapitel 3.1.2. Diese klinische Affektion wurde mit dem Atrophiefaktor verglichen, siehe Tabelle 14.

Tabelle 14: Muskelproben, klinische Affektion und Atrophiefaktor (auf eine Dezimalstelle gerundet).

Muskel	Klinisch betroffen?	Atrophiefaktor
rechter M. deltoideus	nein	50
linker M. biceps brachii	ja	615,4
rechter M. biceps brachii	ja	157,3
linker M. quadriceps femoris	ja	238,1
rechter M. biceps femoris	nein	153,8
linker M. biceps femoris	nein	595,2
rechter M. extensor digitorum	ja	164,2
linker M. extensor digitorum	ja	443,5
rechter M. gastrocnemius	nein	853,2
linker M. gastrocnemius	nein	222,2
zervikale autochthone Rücken- muskulatur	klinisch nicht untersucht	268,3
lumbale autochthone Rücken- muskulatur	klinisch nicht untersucht	155,2
linker M. flexor digitorum	ja	232,9
linker M. tibialis anterior	ja	306,1

Die entnommenen Muskelproben des Patienten hatten alle einen auffälligen Atrophiefaktor von mindestens 50, das spricht dafür, dass es bei der IBM im Krankheitsverlauf zu einer generalisierten Muskelatrophie kommt – zumindest auf histologischer Ebene. Die Ergebnisse des Patienten lassen vermuten, dass trotz unauffälliger Resultate in der klinischen Muskelkraftprüfung auf zellulärer Ebene bereits pathologische Prozesse ablaufen, die zu einer Muskelatrophie führen. Die Muskeln selbst bzw. synergistisch wirkende Muskeln oder funktionelle Muskelgruppen sind noch eine Zeit lang in der Lage, die allmählich entstehende Atrophie zu kompensieren. So bleibt die allmählich entstehende Muskelschwäche – wie bei dem Patienten – klinisch lange unentdeckt, im histologischen Präparat lassen sich aber schon strukturelle Veränderungen feststellen.

Die klinisch beeinträchtigten Muskeln zeigten in der Probe Atrophiefaktoren von mindestens 157,3, was eine weiter fortgeschrittene Atrophie anzeigt. In diesen Fällen scheinen die Kompensationsmechanismen nicht suffizient genug zu sein, um die Muskelschwäche zu verbergen.

Zudem zeigten neben der Atrophie alle Muskelfasern verschieden stark ausgeprägte histopathologische Veränderungen: Es gab in allen Muskelproben mehr Bindegewebe, mehr Fett und eine größere Faserkalibervariabilität als in physiologischem, also gesundem Muskelgewebe. Auch dies ist ein Hinweis darauf, dass die IBM nicht nur einzelne Muskeln, sondern das ganze skelettmuskuläre System betrifft.

3.1.6 Hypertrophie und p62

Bei der IBM liegt eine gestörte Funktionalität des p62 vor, sodass es an der Proteinakkumulation und somit Zellschädigung bzw. Myodegeneration beteiligt ist (siehe Kapitel 1.2.6). Sechs der Muskelproben des Patienten waren positiv für p62 (siehe Abbildung 4) und fünf davon hatten einen Hypertrophiefaktor von über 11 bis zu 172 (siehe Abbildung 8). Lediglich der rechte M. deltoideus hatte eine gesteigerte p62-Expression ohne den Nachweis einer Hypertrophie.

Das gemeinsame Auftreten von p62-Positivität und Hypertrophie in den Muskelfasern könnte auf einen Zusammenhang bei IBM zwischen p62 als Marker von Autophagie bzw. gestörtem Proteinabbau und Hypertrophie als struktureller Veränderung hindeuten.

3.1.7 CD8⁺ und p62

In sechs der Muskelproben des Patienten konnte eine CD8⁺-Invasion festgestellt werden. In fünf dieser Muskelschnitte fanden sich auch p62-positive Muskelfasern in den zufällig ausgewählten Ausschnitten. Der rechte M. gastrocnemius ist der einzige der sechs, welcher eine CD8⁺-Invasion ohne p62-Hochregulation hat; die lumbale autochthone Rückenmuskulatur zeigt eine p62-Positivität ohne CD8⁺-Invasion.

Da in fünf der Muskeln beide Parameter, d. h. CD8⁺-T-Lymphozyten und gesteigerte p62-Expression detektiert wurden, scheinen Autophagie und Inflammation zwei simultan ablaufende Prozesse bei der IBM zu sein (siehe Abbildung 4).

3.1.8 p62 und α BCrystallin

Alle sechs p62-positiven Muskelproben des IBM-Patienten waren sowohl für p62 als auch für α BCrystallin positiv (siehe Abbildung 4).

In den untersuchten Ausschnitten der p62-positiven Proben waren über 15 % der Muskelfasern in der α BCrystallin-Färbung positiv. Beide, p62 und α BCrystallin, sind immunhistochemische Marker für gesteigerte Protein-Akkumulation, die zu Myodegeneration führen kann. Die Koexistenz der beiden Parameter in den Muskelproben bestätigt die vermuteten Zusammenhänge von Zellstress, Proteinakkumulation, Inflammation und Degeneration bei der Pathogenese der IBM.

3.1.9 α BCrystallin und *red-rimmed vacuoles*

Die drei Muskeln, die *red-rimmed vacuoles* in den Ausschnitten in der Trichrom-Färbung enthielten, hatten alle drei auch hohe prozentuale Werte für α BCrystallin: M. biceps brachii links mit 49,4 %, M. extensor digitorum rechts mit 49,0 % und M. gastrocnemius links mit 39,3 % (siehe Abbildung 4). Das Hitzeschockprotein α BCrystallin kommt sowohl in sichtbar geschädigten Muskelfasern vor als auch in morphologisch unauffälligen Fasern, sog. *x-fibers*. Das Auftreten von *red-rimmed vacuoles* hängt mit Prozessen der Proteinakkumulation und Myodegeneration zusammen; das Vorhandensein in Muskelgewebe mit hoher α BCrystallin-Expression ist dazu passend.

3.1.10 α BCrystallin und MHC I

Es gab eine statistisch signifikante Korrelation zwischen α BCrystallin und MHC I in den Muskelproben mit $p = 0,0291$, $\alpha = 0,05$ und $r = 0,5816$ (siehe Abbildung 5). Der Nachweis von MHC I deutet auf einen inflammatorischen Prozess im Muskelgewebe hin; α BCrystallin ist ein Marker für Zellstress, folgender Proteinakkumulation und (Myo-) Degeneration. Die signifikante Korrelation dieser beiden Parameter könnte für ein zeitgleiches Ablaufen dieser Mechanismen bei IBM stehen. Dies zeigt, dass Inflammation und Myodegeneration zeitgleich – anstatt nacheinander – im betroffenen Muskel auftreten bzw. sich gegenseitig bedingen. Es ist nicht erkennbar, inwiefern sich die beiden Prozesse auch in Bezug auf die Einzelfaser simultan ereignen oder hier hintereinander ablaufen. Um dies beurteilen zu können ist eine Einzelfaseranalyse notwendig.

3.2 Laser-Mikrodissektion

Trotz intensiver Vorarbeiten und zahlreicher Variationen im Versuchsablauf konnte die Fragestellung aufgrund methodischer Limitationen nicht beantwortet werden. Die Laser-Mikrodissektion ist ein Verfahren, das schon seit vielen Jahren genutzt wird um spezifische Zielstrukturen aus Gewebeproben, Zellkulturen etc. auszuschneiden und für anschließende Analysen bereitzustellen. Bei der Laser-Mikrodissektion gibt es grundsätzliche Schwierigkeiten, die es für den jeweiligen konkreten Versuchsaufbau zu bewältigen gilt; ein Beispiel ist die RNA-Ausbeute. Ziel der LMD ist es, ausgewählte Strukturen auszuschneiden; dies führt zwangsläufig dazu, dass nur wenig Gewebe für die Isolation der RNA zur Verfügung steht. Da die Konzentration und Integrität der RNA eine Voraussetzung für folgende Analysen beispielsweise eine miRNA-Sequenzierung sind, ist die Bereitstellung einer ausreichenden und hochwertigen RNA-Ausbeute der entscheidende Punkt für die Planung des Versuchsaufbaus.

Beim Arbeiten mit RNA muss auf Sauberkeit und schnelles, präzises Arbeiten geachtet werden. Damit die Degradation und Kontamination bestmöglich verhindert wird, muss vom

Moment der Entnahme der Biopsie bis zum Ende der Extraktion der RNA sorgfältig gearbeitet werden. Auch bei der LMD kann die RNA sowohl durch die Aufbereitung der Proben (Entnahme, Lagerung, Schneiden, Schnittdicke, Färben), durch die LMD an sich, die Menge an ausgeschnittenem Material als auch durch die folgende Extraktion negativ beeinflusst werden (Decarlo et al. 2011; Garrido-Gil et al. 2017). Besonders kritisch sind die Art des Gewebes, die Fixierung und die zeitliche Dauer die das Gewebe in wässrigem Milieu verbringt; zudem spielt das RNase-freie Arbeiten während der Probenaufbereitung eine entscheidende Rolle (Fend und Raffeld 2000).

3.2.1 Schnittdicke

Da ein dickerer Schnitt dazu führt, dass bei gleicher Muskelfaserzahl mehr Gewebe am LMD ausgeschnitten wird, wurden versuchsweise Schnitte zu 10 μm , 20 μm und 30 μm angefertigt. Es zeigte sich, dass bei 30 μm Schnittdicke die Muskelfaserquerschnitte weniger gut voneinander abgegrenzt werden konnten und die Morphologie unsicherer beurteilbar war. Zudem war bei 30 μm das Schneiden und Herausheben der Muskelfasern mittels LMD erschwert. Somit wurden alle folgenden Schnitte mit 20 μm Schnittdicke angefertigt.

3.2.2 Färbungen

In der vorliegenden Arbeit wurde bei den Versuchen nicht die notwendige RNA-Reinheit erreicht; die RNA-Quantität variierte sogar bei gleichbleibendem Versuchsablauf. Insgesamt war die RNA-Ausbeute meist zu gering, d. h. unter den geforderten 33 $\text{ng}/\mu\text{l}$ trotz starker Konzentration bei der RNA-Extraktion. Wenn die RNA-Menge über dem Grenzwert lag, konnte dieser Wert weder reproduziert werden noch war ersichtlich, was die bessere Ausbeute auslöste. Bei Versuchen mit anderen Färbungen gelang es häufig, die gewünschten Zielwerte der RNA zu erreichen bzw. sich ihnen zu nähern.

Nachfolgend sind in Tabelle 15 die verschiedenen LMD-Versuche an Patienten-Biopsien aufgeführt; jeweils genannt sind Färbung, Anzahl der ausgeschnittenen Zellen und die resultierte RNA-Menge. Ausgeschnitten wurden jeweils Zellverbände d. h. statt einzelner Fasern wurden Gruppen von positiv angefärbten Muskelfasern ausgeschnitten, um die LMD-Zeit zu reduzieren.

Tabelle 15: Verschiedene LMD-Versuche mit Myositis-Biopsien und die jeweilige RNA-Ausbeute.

Färbung	Myositis-Form	Anzahl der ausgeschnittenen Muskelfaserquerschnitte	RNA-Menge in ng/ μ l
α BCrystallin Durchlicht	IBM	100	0,7
	IBM	100	1,8
α BCrystallin IF	IBM	50	0,3
	IBM	50	1,0
	IBM	50	1,5
	Nekrotisierende Myopathie	50	16,6
	IBM	100	10,1
	IBM	100	1,2
MHC I IF	Nekrotisierende Myopathie	50	23,2
	Nekrotisierende Myopathie	100	29,5
	Polymyositis	100	50,4
	Polymyositis	200	20,6
MHC I mit DAB	Polymyositis	50	29,5
	Polymyositis	100	15,7
nativ (atrophe Fasern als Ziel- struktur)	IBM	75	16,8
	IBM	75	0,0
	IBM	75	3,0
	IBM	75	43,1
	IBM	100	0,7
	IBM	100	1,1
	IBM	100	1,4
	IBM	100	3,5
NCAM IF	Dermatomyositis	50	53,9

IF = Immunfluoreszenz. Grau markiert sind die Werte, bei denen die RNA-Ausbeute den Grenzwert 33 ng/ μ l überschritten hat.

Die MHC I-Färbungen erfolgten an Biopsien von Patienten mit Polymyositis bzw. Nekrotisierender Myopathie; die NCAM-Färbung an einer Dermatomyositis-Biopsie. Da die MHC I und NCAM-Färbungen bei der IBM ein ähnliches Färbungsergebnis aufweisen wie bei PM, DM und NM, konnten sie als gleichwertiger Ersatz verwendet werden.

Die α BCrystallin-Färbung wurde in einem Fall an der Biopsie eines Nekrotisierende Myopathie-Patienten gefärbt und atrophe Fasern als Zielstruktur ausgeschnitten. Unerwartet war die RNA-Menge hierbei höher als bei den IBM-Biopsien, die mit dem α BCrystallin-Protokoll gefärbt wurden. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die geringe RNA-Ausbeute damit zu erklären ist, dass in den α BCrystallin-positiven Muskelfasern der IBM-Patienten eine besonders starke Degradation der RNA erfolgt ist. Das könnte wiederum eine Folge davon sein, dass in den α BCrystallin-positiven Muskelfasern die Prozesse der Degeneration verstärkt ablaufen.

3.2.3 Fluoreszenz-Färbungen

Die Durchführung von Fluoreszenzfärbungen führt meistens zu einem eindeutigeren Signal als eine Durchlichtfärbung und erleichtert somit die Untersuchung von immunhistochemischen Fragestellungen. Doch die Färbeprotokolle sind in der Regel durch lange Inkubationszeiten zeitaufwändig. Zudem sollen viele Schritte, allen voran die Inkubationen, idealerweise in wässrigem Milieu stattfinden. Die beiden Faktoren Zeit und wässriges Milieu sind zwar für die Färbequalität vorteilhaft, führen aber zu einer Reduktion der RNA-Qualität.

Für die LMD waren Fluoreszenzfärbungen problematisch, da der Laser das Färbesignal im umliegenden Gewebe abschwächte, die Feuchtigkeit der Fixierung das Ausschneiden und Herausheben der Zellen erschwerte und der LMD-Prozess in einem abgedunkelten Raum stattfinden musste.

3.2.4 Durchlicht-Färbungen

Da die Kombination von Fluoreszenzfärbung und LMD viele Schwierigkeiten mit sich bringt und die LMD-Technik deutlich besser an Durchlicht-Färbungen durchzuführen ist, wurden auch Durchlichtfärbungen für die vorliegende Fragestellung eingesetzt. Tatsächlich konnte das Schneiden viel präziser und schneller am LMD realisiert werden. Bei der MHC I-Durchlichtfärbung konnte eine RNA-Ausbeute erreicht werden, die in einer besseren Größenordnung war. Doch die α BCrystallin-Durchlichtfärbung mit Alkalischer Phosphatase und Neufuchsin führte weder zu einem gut sichtbaren Färbesignal für α BCrystallin, noch zu einer Verbesserung der RNA-Integrität im Vergleich zur Fluoreszenzfärbung.

3.2.5 Fixierung nach der Färbung

Eine Schwierigkeit bei der Arbeit mit Fluoreszenzfärbungen und Laser-Mikrodissektion ist die Fixierung. Einerseits sollen Fluoreszenzfärbungen feucht bleiben, solange sie nicht mit

Fluoromount oder ähnlichem eingebettet sind, andererseits können die Membran-Objektträger nicht eingedeckelt werden. Daraus ergeben sich zwei Problematiken: einerseits sind im wässrigen bzw. feuchten Milieu die RNAsen sehr aktiv; andererseits ist das Schneiden mittels LMD bei feuchtem Gewebe sehr viel aufwendiger, ungenauer und langwieriger. Damit allerdings die Qualität der Färbung erhalten bleibt, muss der Schnitt dennoch feucht gelagert sein und dann zügig weiterverarbeitet werden. Doch auch wenn der Schnitt sofort nach dem Färben zum LMD-Mikroskop transportiert wird, braucht er eine Fixierung, wofür verschiedene Optionen ausprobiert wurden.

3.2.5.1 Isopropanol

Isopropanol ist das bevorzugte Fixierungsmittel für eine Fluoreszenz-Färbung, wenn eine Einbettung nicht möglich ist. Durch Isopropanol und andere Alkohole wird allerdings die Membran des MMI-Objektträgers wellig, was wiederum die Arbeit am LMD verkompliziert. Also wurden mehrere Versuche gemacht, um zu testen, wie lang die Schnitte idealerweise im Isopropanol gelagert sein sollen. Als beste Methode zeigte sich folgender Ablauf: Direkt nach der Färbung den Membran-Objektträger kurz für wenige Minuten in Isopropanol stellen, anschließend unter einem Abzug trocknen lassen und sofort zum LMD-Mikroskop bringen. All diese Schritte fanden unter höchstmöglicher Vermeidung von Lichteinstrahlung statt. Vor der LMD wurde der Schnitt nochmal kurz getrocknet falls die Membran noch nicht vollständig trocken war.

3.2.5.2 Weitere Fixierungsvarianten für die Färbungen

Neben Isopropanol wurden weitere Fixierungen getestet und ihr Einfluss auf die Morphologie des Gewebes und die RNA-Qualität beurteilt. Weder PFA oder PFA plus Methanol noch abschließendes Waschen in PBS ermöglichten eine ausreichende RNA-Ausbeute.

3.2.6 Isolation der Zielzellen mittels Laser-Mikrodissektion

Nachdem die Schnitte gefärbt und fixiert waren, wurden sie umgehend zur LMD gebracht. Die Reaktionsröhrchen wurden vor der Verwendung auf Trockeneis gelagert, da sich zeigte, dass die ausgeschnittenen Muskelfasern besser am Deckel haften, wenn dieser vorher gekühlt war. Der Membranobjektträger wurde dann zusammen mit einem Glasobjektträger auf den Objektisch des Mikroskops gelegt. Der aktuelle Schnitt wurde erst in einer 10-fachen Vergrößerung betrachtet, um einen Eindruck über die Fluoreszenzfärbung zu gewinnen. Dann wurde ein geeignetes Areal ausgewählt, das möglichst viele Zielzellen und nur wenig Fett und Bindegewebe enthielt. Anschließend wurden einzelne Muskelfasern und Zellverbände bzw. größere Gruppen von Muskelfasern mit dem Laser ausgeschnitten. Hierfür wurden mithilfe eines Stifts am Touchscreen des Computers die gewünschten Muskelfasern manuell eingekreist und so die Schnittlinien für den Laser markiert. Der Laser schnitt dann entlang dieser Markierungen. Mithilfe der sog. *CapLift technology* konnte dann der Deckel des Reaktionsgefäßes leicht auf den Schnitt gedrückt werden, sodass das ausgeschnittene Gewebe am

adhäsiven Deckel haften blieb. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis genügend ausgeschnittene Zielzellen auf dem Deckel gesammelt wurden. Im Anschluss konnte dem Reaktionsröhrchen ggf. Lysis-Puffer hinzugegeben werden oder es wurde direkt verschlossen auf Trockeneis gelagert. Die vielfältigen Schwierigkeiten, die sich beim LMD-Arbeitsschritt ergaben, sind im Folgenden erläutert.

3.2.6.1 Schwierigkeiten bei der LMD: Fett und Bindegewebe

Das Schneiden mithilfe des Lasers und auch das Anheben des Zielgewebes werden durch Fett und Bindegewebe erschwert. Beide Strukturen sind schwieriger zu durchtrennen als Muskelfasern, sodass der Laser sehr häufig über die gleiche Stelle schneiden musste. Hierbei wurden die umliegenden Zellen in Mitleidenschaft gezogen, da durch das wiederholte Schneiden die Schnittländer sehr unscharf wurden und so das angrenzende Gewebe beschädigt wurde. Der Versuch, das ausgeschnittene Gewebe herauszuheben stellte sich ebenfalls als kompliziert dar, wenn Fett und Bindegewebe im Bereich der Schnittkante lagen. Somit verzögert sich der zeitliche Ablauf durch die Tatsache, dass es sich um Biopsien von IBM-Patienten handelte und es konnte nicht so schnell gearbeitet werden wie mit gesundem Muskelgewebe.

3.2.6.2 Schwierigkeiten bei der LMD: Einschlusskörpermyositis als Erkrankung

Die Einschlusskörpermyositis ist eine seltene Erkrankung und Muskelbiopsien von IBM-Patienten sind rar. Da das Material nur begrenzt zur Verfügung steht, konnten die Versuche nicht beliebig oft wiederholt werden und es wurde immer nur ein Schnitt bzw. wenige Schnitte pro Experiment verwendet. Somit konnten die variierten Schritte im Versuchsablauf immer nur an wenigen Schnitten ausprobiert werden und es lässt sich keine Aussage treffen, ob es nur ein einmaliges Ereignis war, dass der Versuchsablauf nicht die gewünschte RNA-Ausbeute ergab. Außerdem können pro Biopsie nicht beliebig viele Serienschnitte gemacht werden, damit von jeder der Zielstrukturen in mehreren Serienschnitten zusammengerechnet hunderte Muskelfasern ausgeschnitten werden können. Die Versuche wurden daher teilweise nur mit 50 bis 200 ausgeschnittenen Muskelfaserquerschnitten durchgeführt, da eine höhere Anzahl mehr Schnitte bedeuten würde. Der Bestand an IBM-Biopsien sollte aber nicht zu sehr reduziert werden, sodass nur eine begrenzte Reihe an Versuchen möglich war.

3.2.6.3 Schwierigkeiten bei der LMD: Laser und Fluoreszenzfärbungen

Wenn in einem Areal eine Muskelfaser bzw. ein Zellverband ausgeschnitten wurde und der Laser wiederholte Male die beabsichtigte Schnittlinie langfahren musste (z. B. weil Bindegewebe und Fett das Schneiden erschwerten), dann resultierte daraus eine abnehmende Fluoreszenz-Intensität im umliegenden Gewebe. Die starke Lichteinwirkung des Lasers ließ die Färbung schwächer erscheinen und die Differenzierung zwischen positiven und negativen Muskelfasern war im angrenzenden Gewebe verfälscht.

Um möglichst genau und spezifisch die gewünschten Zielstrukturen zu isolieren, wurde versucht einzelne Muskelfasern (z. B. eine, die α BCrystallin-positiv ist und eine normale Morphologie zeigt) auszuschneiden. Doch das Herauslösen einzelner Zellen bei der Fluoreszenzfärbung war zum einen sehr zeitaufwändig und andererseits in den meisten Fällen nicht ausreichend akkurat. Da die Muskelfasern eng aneinander liegen, war es sehr schwierig, die Schnittkante des Lasers so dicht wie erforderlich neben dem Sarkolemm entlang zu führen. Dies führte dazu, dass meistens entweder noch Gewebe der umliegenden Muskelfasern am Rand der Zielzelle haftete (\rightarrow wenn der Laser etwas zu weit neben das Sarkolemm schnitt) oder die Zielzelle nicht mehr intakt war (\rightarrow wenn der Laser zu nah am Sarkolemm und somit in die Zielzelle hineinschnitt). Dies führte dazu, dass das Ausschneiden einzelner Muskelfaserquerschnitte nicht weiterverfolgt werden konnte. Stattdessen wurden Zellverbände der Zielstruktur ausgeschnitten. Bei den Zellverbänden konnte zwar nicht gewährleistet werden, dass es sich ausnahmslos um Fasern der Zielstruktur handelte; dies war aber auch bei der Isolation einzelner Zellen nicht zufriedenstellend möglich. Somit stellte sich das Herauslösen von Zellverbänden als die bessere Option dar. Hierbei konnte wesentlich zeiteffizienter d. h. RNA-schonender gearbeitet werden.

Da die Fluoreszenzfärbungen auf den Membran-Objektträgern nicht mit Fluoromount o. ä. eingebettet werden können, müssen sie, um die Färbung zu erhalten, im wässrigen Milieu aufbewahrt werden. Dies steht allerdings im Widerspruch zu dem Ziel, eine möglichst gute RNA-Ausbeute zu erhalten. Im wässrigen Milieu sind die RNasen aktiver, sodass die Zeit der Schnitte in der Fixierung möglichst kurz sein muss. Des Weiteren führt langer Kontakt der Objektträger-Membran mit Isopropanol dazu, dass die Membran wellig wird, was wiederum das Schneiden mit dem Laser und das Herausheben des Gewebes erschwert. Zusammengefasst bedeutet dies, dass eine Aufbewahrung des Schnittes im trockenen Milieu vorteilhaft für die RNA-Qualität und die Laser-Mikrodissektion ist, aber einen Nachteil für die Fluoreszenzfärbung darstellt. Um diesem Dilemma zu entgehen, wurden die Schnitte nur für wenige Minuten mit Isopropanol fixiert, anschließend unter einem Abzug getrocknet und dann direkt zur Weiterverarbeitung zum LMD-Mikroskop gebracht. Das Problem hieran ist, dass die Schnitte nach der Laser-Mikrodissektion nicht wiederverwendet werden können. Eine erneute Aufbewahrung in Isopropanol würde für die RNA-Qualität und die Membran schädlich sein; Einfrieren oder trockene Lagerung wäre hingegen für die Färbung nicht möglich. Somit konnte jeder Schnitt bzw. Objektträger für nur einen Versuch verwendet werden, was sich entsprechend zeitaufwändig gestaltete.

Die Abbildung 9 zeigt Beispiele, bei denen α BCrystallin-positive Muskelfasern mit normaler Morphologie mithilfe von LMD aus einer IBM-Biopsie herausgeschnitten wurden.

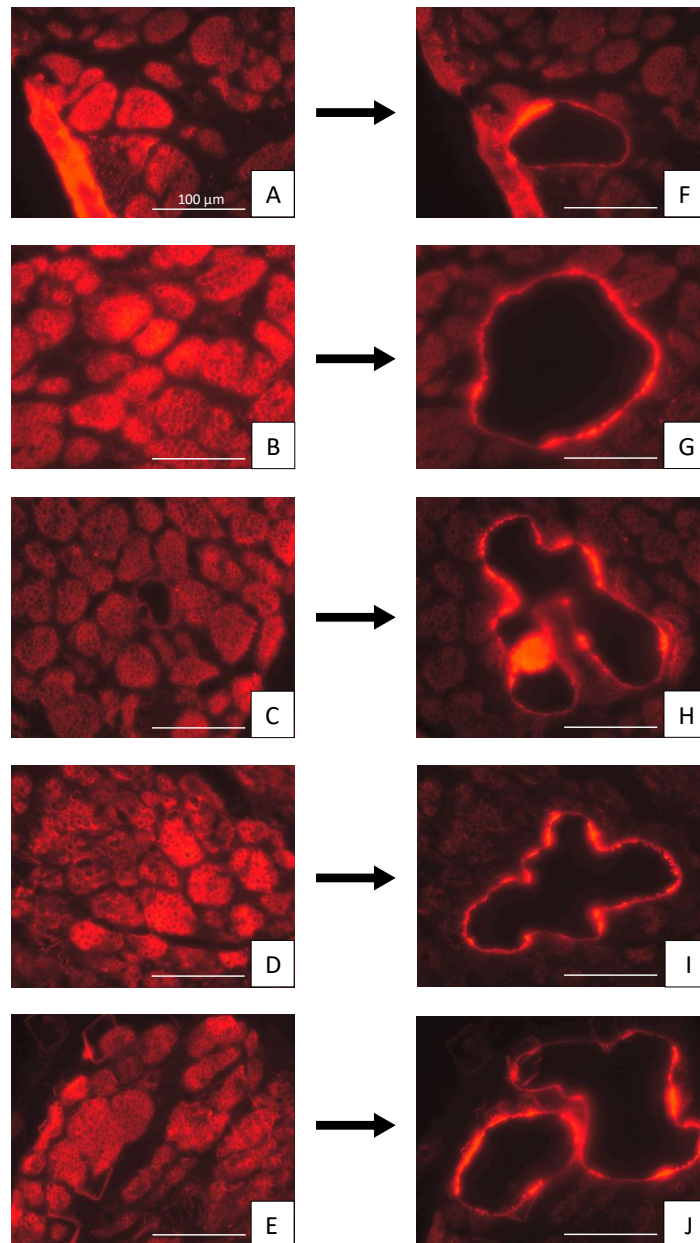


Abbildung 9: Beispiele der Laser-Mikrodissektion an IBM-Biopsien.

Muskelgewebe vor dem Schneiden (A bis E) und nachdem α BCrystallin-positive Muskelfasern mit normaler Morphologie mittels LMD herausgeschnitten wurden (F bis J) in 20-facher Vergrößerung.

3.2.7 Fixierung der ausgeschnittenen Muskelfasern

Die ausgeschnittenen Muskelfasern bzw. -gruppen hafteten am adhäsiven Deckel des Reaktionsröhrchens. Es ergaben sich nun zwei Varianten, das Muskelgewebe auf die anschließende RNA-Extraktion vorzubereiten: Einerseits konnte das Reaktionsgefäß verschlossen auf Trockeneis gelagert werden, ehe kurz später die RNA-Extraktion durch Hinzufügen von Trizol begann. Die andere Option war, direkt im Anschluss an das Schneiden bei Raumtemperatur Trizol in das Reaktionsgefäß zu pipettieren und durch Schwenken des Reaktionsge-

fäßes die ausgeschnittenen Strukturen im Trizol in eine Suspension zu überführen. Es wurden verschiedene Inkubationszeiten ausprobiert (5 min, 15 min, 30 min, 60 min), doch es zeigte sich in Bezug auf die RNA-Ausbeute keine relevante Veränderung. Da es sich als praktikabler erwies die Reaktionsgefäße direkt auf Trockeneis zu lagern, zeitnah im Labor mit der RNA-Isolation zu beginnen und in diesem Fall die RNA-Ausbeute besser war als bei direkter Zugabe von Trizol, wurde dieses Verfahren bevorzugt.

3.2.8 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mithilfe zweier Kits nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurden sowohl das RNA Clean & Concentrator-5 Kit von Zymo Research als auch das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet, welche beide etablierte Standard-Verfahren für die RNA-Extraktion sind. Zwischen den Kits war kein Unterschied in Bezug auf Qualität und Quantität der RNA feststellbar. Somit ist es unwahrscheinlich, dass eines der beiden RNA-Isolations-Protokolle ausschlaggebend für die Unzulänglichkeit der RNA war.

In einem zusätzlich eingeführten Schritt wurde die Suspension aus ausgeschnittenen Zellen und Trizol in einem Homogenisator weiter aufgeschlüsselt. Auch dieser Schritt konnte die RNA-Ausbeute nicht maßgeblich verbessern.

3.2.9 Vergleich zu frischen Biopsien von gesunden Patienten

Sowohl eine jahrelange Lagerung der IBM-Biopsien als auch die Degeneration, die im Zuge der IBM im Muskelgewebe abläuft, können dazu führen, dass die RNA in den Biopsien an sich keine gute Qualität aufweist und bereits ein Großteil der RNA degradiert ist. Somit wurden Vergleichsversuche mit frischem Muskelgewebe muskelgesunder Patienten gemacht. Hierfür wurde Muskelgewebe verwendet, das bei Knie-Operationen (beispielsweise Kreuzband-Operationen) von muskelgesunden, jungen Patienten entnommen wurde. Das Muskelgewebe war somit nur wenige Tage alt und da es sich um junge, muskelgesunde Patienten handelte war zu erwarten, dass das Gewebe eine ideale Qualität ohne Myodegeneration hatte.

Die 20 µm-dicken Schnitte wurden mit H.E.- oder einer zweifachen Fasertypenfärbung d. h. Immunfluoreszenz, gefärbt. Anschließend wurde eine unterschiedliche Anzahl von Muskelfaserquerschnitten mittels Laser-Mikrodissektion ausgeschnitten und die Reaktionsgefäße auf Trockeneis gelagert, ehe die RNA-Extraktion erfolgte. In Tabelle 16 sind die RNA-Mengen aufgelistet, die aus den Versuchen mit frischen Muskelbiopsien von neuromuskulär unauffälligen Patienten resultierten.

Tabelle 16: Verschiedene LMD-Versuche an frischem Muskelgewebe und die jeweilige RNA-Ausbeute.

Färbung	Anzahl der ausgeschnittenen Muskelfaserquerschnitte	RNA-Menge in ng/μl
H.E.	50	90,2
	100	20,9
	200	192,8
Fasertypenfärbung (zweifach)	100	28,9
	100	30,3
	100	17,8
	100	92,5

Die Ergebnisse dieser Versuche sind deutlich besser als bei den Versuchen mit IBM-Biopsien. Auch die RNA-Reinheit erreichte meistens die gewünschten Zielwerte. Es zeigte sich, dass sowohl bei Durchlicht- als auch bei Fluoreszenzfärbungen von Muskelgewebe RNA-Ausbeuten erreicht werden können, die eine miRNA-Sequenzierung ermöglichen.

In Tabelle 17 sind die Unterschiede zwischen den Versuchen mit IBM-Biopsien und frischem Muskelgewebe aus elektiven Knie-Operationen aufgelistet.

Tabelle 17: Vergleich der Versuche mit IBM-Biopsien und frischem Muskelgewebe aus elektiven Knie-Operationen.

Kriterium	IBM-Biopsien	Muskelgewebe aus elektiven Knie-Operationen
Muskelgewebe	pathologisch (gesicherte IBM-Diagnose)	physiologisch (junge, neuromuskulär unauffällige Patienten)
Entnahme und Lagerung	variabel	ab der Operation sterile Lagerung unter optimalen Bedingungen
Dauer von Entnahme bis LMD-Versuch	bis zu fünf Jahre	wenige Tage
LMD-Zielstrukturen	Ausschneiden der Zielstrukturen als einzelne Muskelfaserquerschnitte bzw. Muskelfaserblöcke bzw. größere Areale	keine konkreten Zielstrukturen vorhanden d. h. Ausschneiden größerer Areale von Muskelfaserquerschnitten

3.2.10 Zusammenfassung

Trotz diverser Veränderungen im Versuchsablauf konnte keine Methode etabliert werden, mit der spezifische Muskelfasern aus den IBM-Biopsien mittels LMD für eine miRNA-Sequenzierung bereitgestellt werden können. Abbildung 10 zeigt die Variationen im Versuchsablauf als schematische Übersicht.

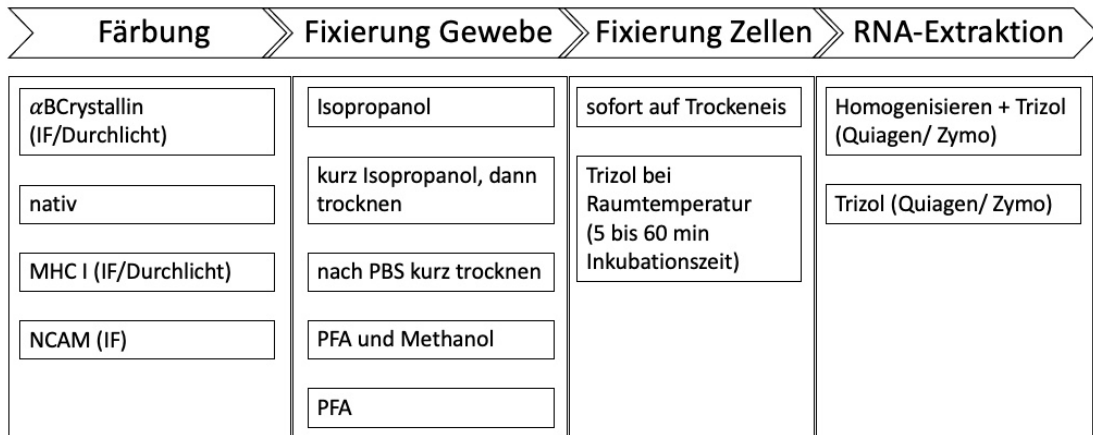


Abbildung 10: Überblick über die verschiedenen LMD-Versuche.

Obwohl in einigen Versuchsabläufen ausreichende RNA-Mengen erzielt wurden, reichte die Qualität nicht aus, um verwertbare Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion (engl: *polymerase chain reaction*, PCR) zu erlangen. Das Problem der RNA-Quantität hätte sich mithilfe einer Amplifizierung prinzipiell beheben lassen können, doch bei einer derart mangelhaften Qualität ist eine Amplifizierung nicht zielführend, da auch defekte RNA-Anteile vermehrt werden. Die durchweg ungenügende Qualität wurde zum Anlass genommen, eine PCR aus einer der Proben durchzuführen. Als Primer wurden Interleukin-6 (IL-6), *amyloid precursor protein* (APP), CXC-Ligand-9 (CXCL9) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die PCR bestätigte die Vermutung, dass es sich um vorwiegend unspezifische RNA bzw. deren Fragmente gehandelt hat. Dafür kann es verschiedene Ursachen geben z. B. Arbeitsschritte, die zur RNA-Degradation führten oder eine zu hohe endogene RNase-Aktivität. Zusätzlich können Verunreinigungen bei der Biopsientnahme, deren Aufbereitung bzw. der Lagerung über viele Jahre als Störfaktor hinzugekommen sein.

Die Einschlusskörpermyositis ist eine seltene Erkrankung und IBM-Muskelbiopsien für Forschungszwecke sind rar. Somit konnten die Versuche nicht beliebig oft mit geänderten Versuchsbedingungen wiederholt werden. Da viele Bedingungen variiert wurden ohne die gewünschte RNA-Quantität und -Qualität zu erlangen, wurden die Versuche zur LMD eingestellt.

3.3 Einzelfaser-Analyse

Mithilfe der Einzelfaser-Analyse konnten Muskelfasern im longitudinalen Verlauf analysiert werden. Dies bedeutet, dass für einen Marker geprüft werden konnte, welche anderen Marker zeitgleich in derselben Muskelfaser exprimiert wurden. Anhand dieser Ergebnisse können simultane Prozesse in der Pathogenese der Einschlusskörpermyositis festgestellt werden. Zudem konnten zwei quantitative Analysen vorgenommen werden: Einerseits konnte erhoben werden, wie viele Muskelfasern pro Färbung in Bezug auf die Anzahl aller Muskelfasern des Schnittes prozentual positiv angefärbt waren. Andererseits konnte ausgehend von einer Zielstruktur ($n = 100$ α BCrystallin-positive bzw. -negative Muskelfasern) ebenfalls der prozentuale Anteil der anderen Marker bestimmt werden. Somit konnten beispielsweise die Zielstrukturen α BCrystallin-Positivität und -Negativität miteinander verglichen werden.

Da bei allen Muskelfasern der vier Biopsien das Sarkolemm positiv für MHC I war, wurden bei MHC I die Zellen gezählt, die nicht nur sarkolemmal MHC I exprimierten, sondern auch im Sarkoplasma eine MHC I-Expression zeigten.

3.3.1 Quantitative Analyse des Muskelschnitts

Für die quantitative Analyse des ganzen Schnittes wurden alle positiven Fasern der jeweiligen Färbung durch die Gesamtzahl der Muskelfasern des Schnittes dividiert. Daraus ergab sich für jede Biopsie eine Prozentzahl für die einzelnen Färbungen.

In Abbildung 11 ist diese quantitative Analyse der gesamten Schnitte der vier IBM-Biopsien dargestellt.

Einzelfaseranalyse alle Zellen quantitativ

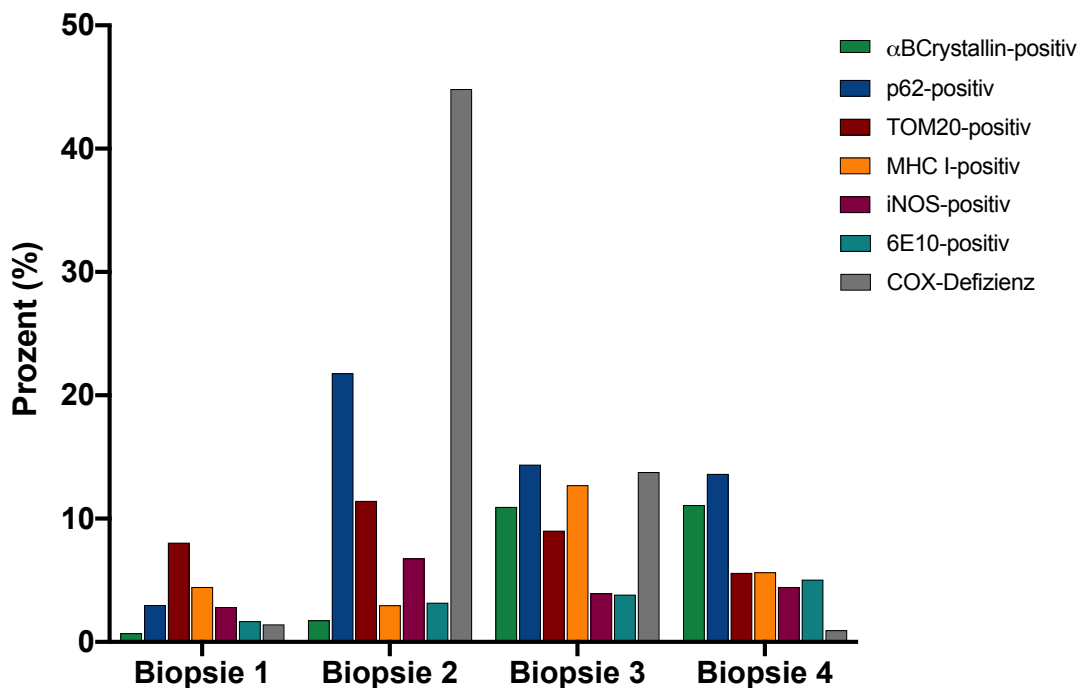


Abbildung 11: Prozentualer Anteil der positiven Muskelfasern der jeweiligen Färbung an der Gesamtzahl der Muskelfasern im Schnitt.

Auf der x-Achse sind die vier IBM-Biopsien mit jeweils einem Balken pro Färbung (α BCrystallin, p62, TOM20, MHC I, iNOS, 6E10, COX) dargestellt; an der y-Achse kann der Prozentwert abgelesen werden.

Der auffälligste Wert der Graphik ist die COX-Defizienz in Biopsie 2. In dieser Biopsie lag der Anteil der COX-defizienten Fasern bei 44,8 %, wohingegen bei den anderen drei Biopsien nur 0,9 % (Biopsie 4), 1,4 % (Biopsie 1) bzw. 13,8 % (Biopsie 3) der Muskelfasern eine COX-Defizienz hatten.

Auch bei p62 zeigte sich eine sehr inhomogene prozentuale Verteilung. Der Prozentwert lag zwischen 21,8 % (Biopsie 2) und 3 % (Biopsie 1).

Sowohl COX-Defizienz, p62-Positivität, TOM20-Positivität als auch iNOS-Positivität waren prozentual bei der Biopsie 2 am meisten vertreten. Die höchsten Prozentwerte für α BCrystallin und 6E10 befanden sich in Biopsie 4. Bei der Biopsie 3 war der prozentuale Anteil der MHC I-positiven Muskelfasern im Vergleich zu den anderen Biopsien am größten. Die beiden Marker iNOS (2,8 % bis 6,8 %) und 6E10 (1,7 % bis 5 %) waren vergleichsweise homogen verteilt und zeigten keine so starken Abweichungen der Prozentwerte zwischen den Biopsien wie die anderen Marker.

Insgesamt fällt in der Graphik auf, dass in Biopsie 1 alle Marker vergleichsweise schwach exprimiert waren und für alle Färbungen der tiefste bzw. zweittiefste Prozentwert in dieser

Biopsie zu finden war. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich im Vergleich zu den anderen drei Biopsien um ein früheres Stadium in der Pathogenese der IBM handelte.

Die Biopsie 2 zeigte eine sehr starke Expression der Marker p62, TOM20, iNOS und COX-Defizienz und hatte bei diesen vier Färbungen jeweils den höchsten prozentualen Anteil. Auch bei der histologischen Betrachtung des Schnittes fiel auf, dass in dieser Biopsie sehr viele Entzündungszellen im Muskelgewebe zu finden waren, eine sehr große Faserkalibervariation bestand, der Anteil von Fett- und Bindegewebe erhöht war und das verbliebene Muskelgewebe zum Großteil eine abnorme Morphologie hatte. Diese Faktoren deuteten darauf hin, dass es sich bei dem biopsierten Muskel um einen stark geschädigten Skelettmuskel handelte. Die prozentuale Auswertung der Immunhistochemie bestätigte diesen Eindruck, da die starke Hochregulation von p62, TOM20, iNOS und COX-Defizienz auf Proteinakkumulation, mitochondriale Schädigung, Inflammation und Myodegeneration hindeutet.

In Biopsie 3 waren die prozentualen Anteile von α BCrystallin, p62, TOM20, MHC I und COX-Defizienz verhältnismäßig ausgeglichen (9 % bis 14,4 %) und iNOS wie auch 6E10 zeigten ähnliche Prozentwerte (8,9 % und 3,8 %). Dieser Schnitt hatte von den vier Biopsien den höchsten prozentualen Anteil an Muskelfasern, die eine verstärkte MHC I-Expression zeigten. Wenn man die Schnitte der vier Biopsien vergleicht, dann wies Biopsie 3 eine vergleichsweise starke immunhistochemische Positivität der Marker auf: Für α BCrystallin, p62, TOM20, 6E10 und COX-Defizienz wurden jeweils die zweithöchsten Prozentwerte bzw. für MHC-I der höchste Prozentwert der vier Biopsien in dieser Biopsie festgestellt. Diese hohe Expression aller Marker ist ein Hinweis darauf, dass sich der Patient aus histologischer Sicht ebenfalls in einem fortgeschrittenen Stadium der Pathogenese der IBM befand.

Die Biopsie 4 hatte den prozentual höchsten Anteil an α BCrystallin-positiven Muskelfasern. Die Prozentwerte für α BCrystallin (11,1 %) und p62 (13,6 %) sind deutlich höher als die vier Marker TOM20 (5,6 %), MHC I (5,6 %), iNOS (4,5 %) und 6E10 (5 %), die sehr vergleichbare Verteilungen aufwiesen. Der Anteil an COX-Defizienz war in dieser Biopsie am geringsten.

Des Weiteren gibt es zwei Aspekte, die in der Abbildung 11 auffielen, wenn man die Biopsien miteinander verglich. In allen Biopsien war der prozentuale Anteil an α BCrystallin-positiven Muskelfasern geringer als an p62-positiven Fasern. In Biopsie 2 unterschieden sich die beiden Werte um ca. 20 %, in den anderen drei Biopsien war der Unterschied deutlich geringer. Der zweite Aspekt, der bei genauerer Betrachtung auffiel, war, dass p62 in allen vier Biopsien einen höheren prozentualen Anteil hatte als 6E10. Beide Marker sind Zeichen für einen gestörten Proteinabbau und darauffolgende Proteinakkumulation. Man würde erwarten, dass die beiden Marker ähnlich exprimiert werden; dies war in der vorliegenden Analyse der vier IBM-Biopsien allerdings nicht der Fall.

3.3.2 Analyse des longitudinalen Verlaufs

Neben der quantitativen Analyse des ganzen Schnitts wurden Zielstrukturen festgelegt, um den Zellstress bei der Eisschlusskörpermyositis näher zu untersuchen. Als Zielstrukturen wurden $n = 100$ α BCrystallin-positive und -negative Muskelfasern in ihrem longitudinalen Verlauf verfolgt. Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen pro Biopsie ein Beispiel, wie die Einzelfaseranalyse durchgeführt wurde: Die α BCrystallin-positiven Muskelfasern sind in jeder Färbung mit einem Pfeil markiert. In der unmittelbaren Nachbarschaft zu dieser α BCrystallin-positiven Muskelfaser wurden dann α BCrystallin-negative Muskelfasern gesucht, die ebenfalls in den verschiedenen Färbungen bezüglich ihres Färbeverhaltens analysiert wurden (markiert mit einem Punkt).

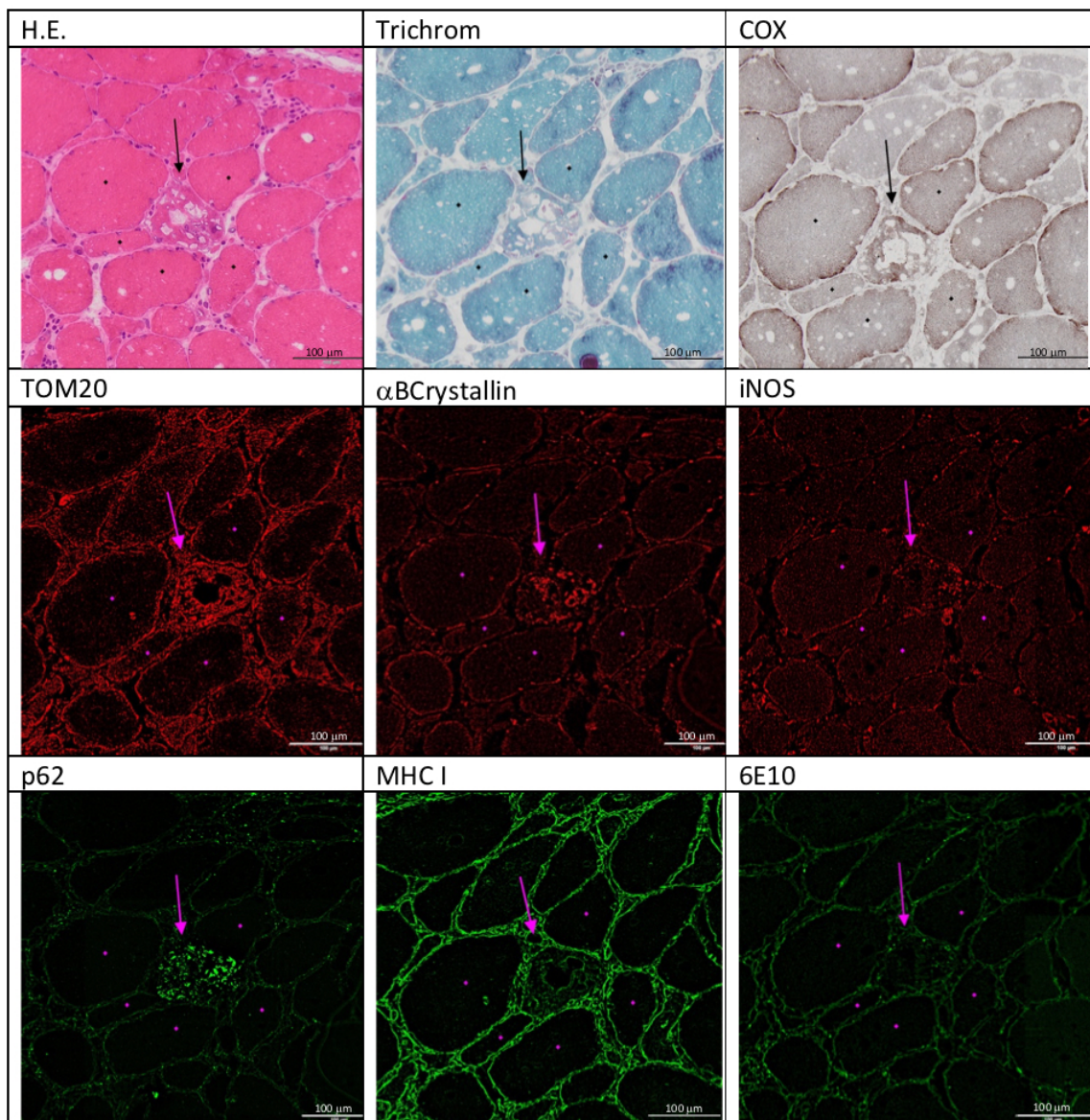


Abbildung 12: Biopsie 1.

→ = α BCrystallin-positive Muskelfaser, • = benachbarte α BCrystallin-negative Muskelfasern.

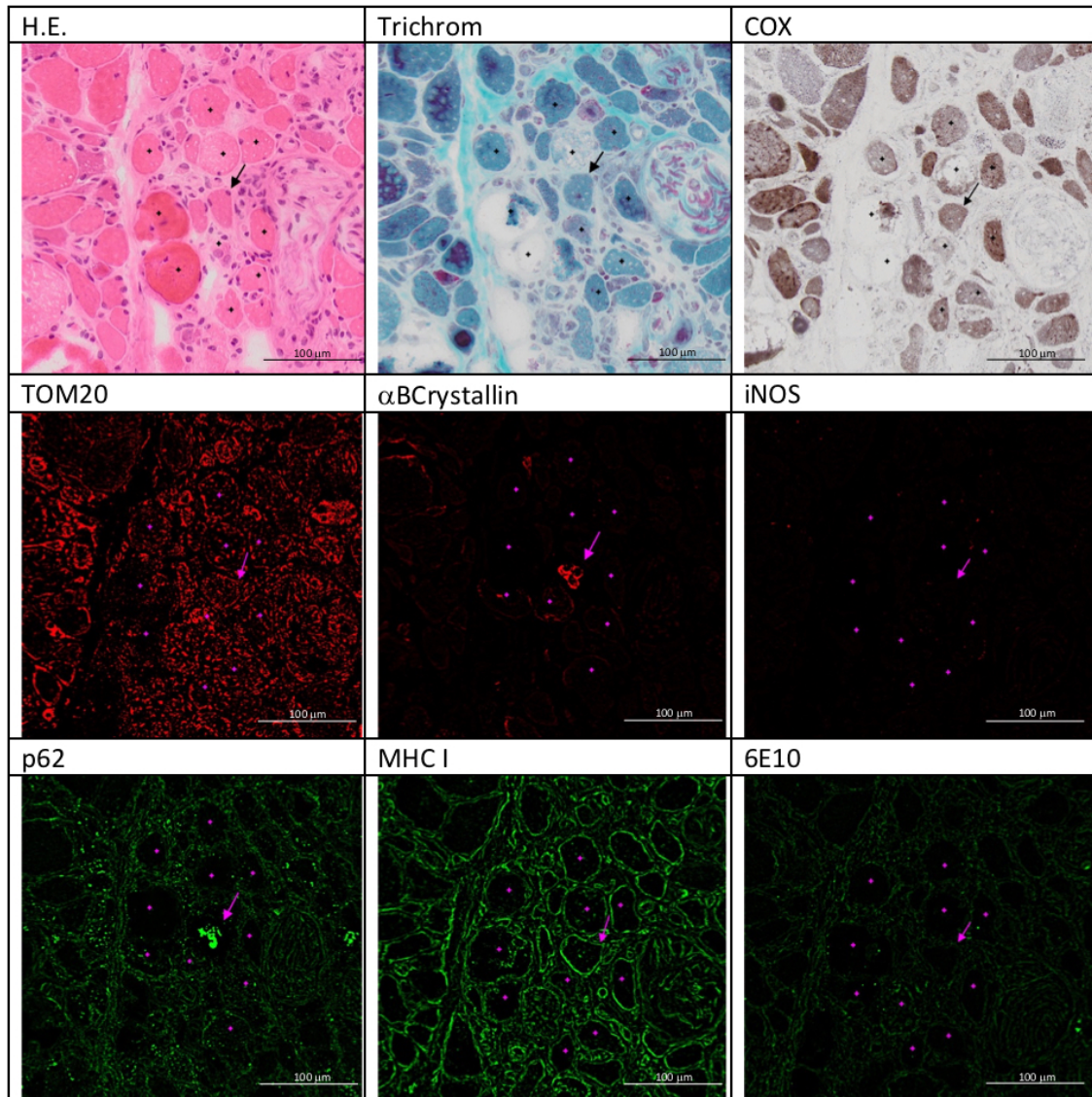


Abbildung 13: Biopsie 2.

→ = α BCrystallin-positive Muskelfaser, • = benachbarte α BCrystallin-negative Muskelfasern.

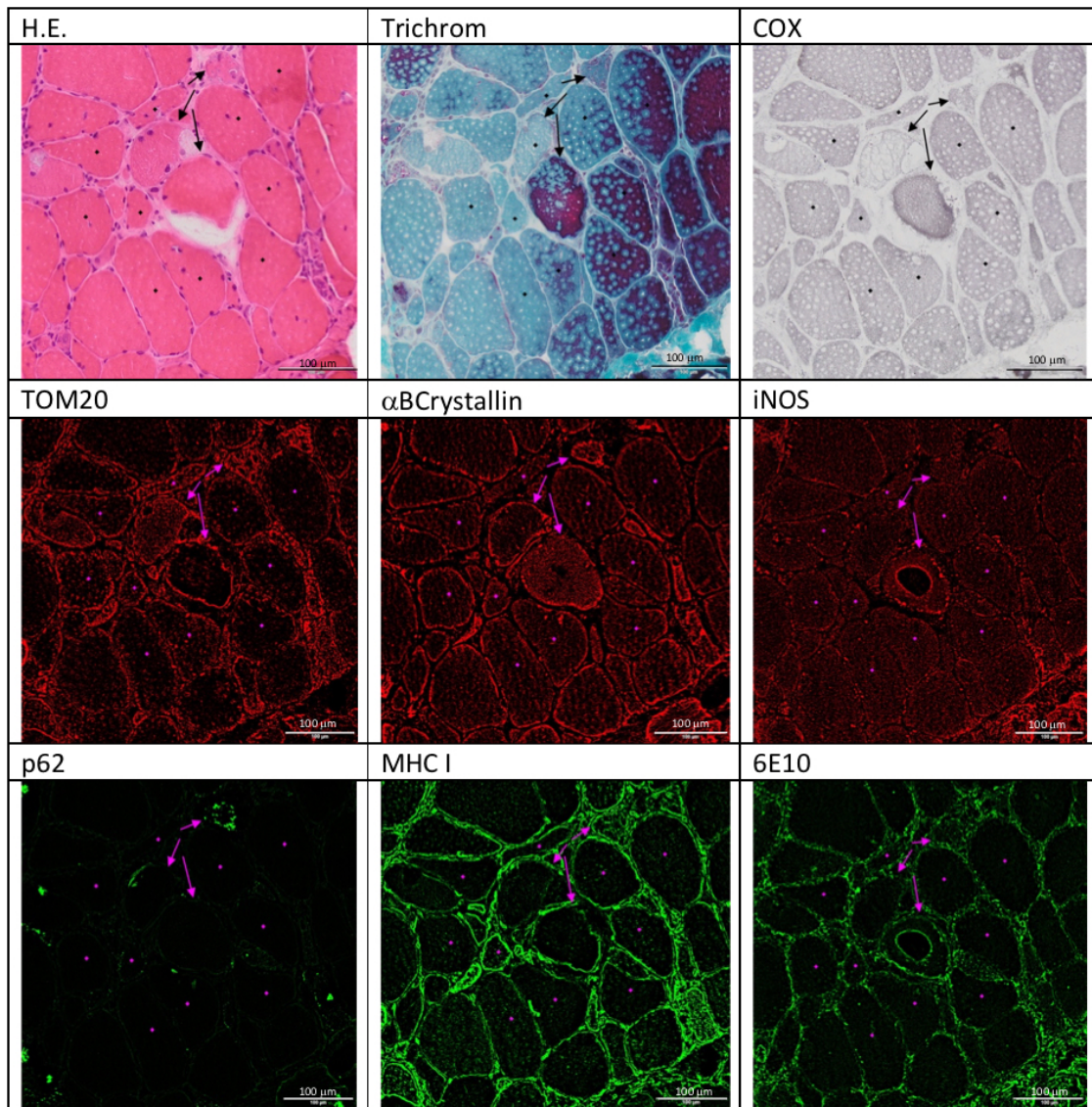


Abbildung 14: Biopsie 3.

→ = αBCrystallin-positive Muskelfasern, • = benachbarte αBCrystallin-negative Muskelfasern.

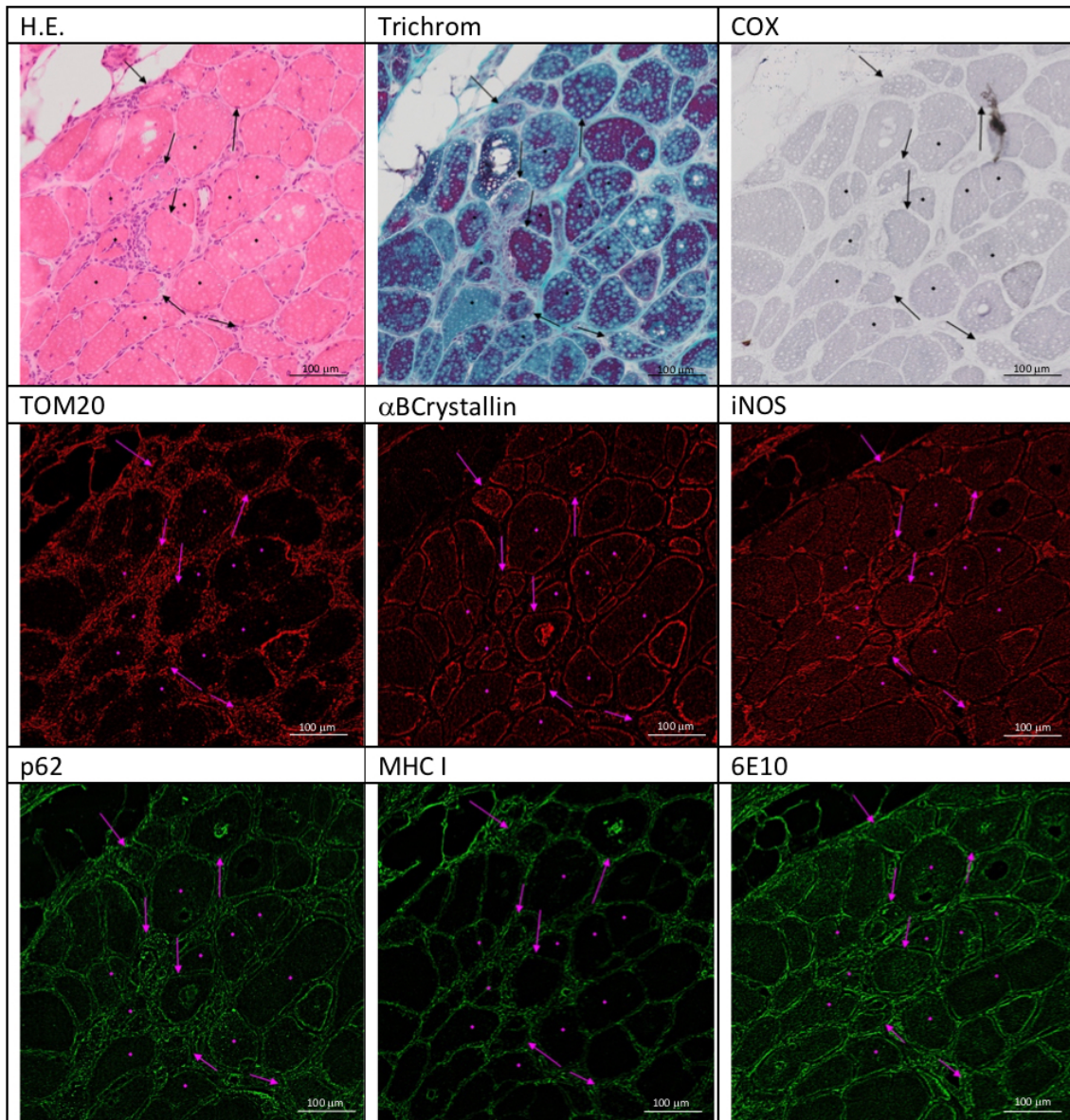


Abbildung 15: Biopsie 4.

→ = αBCrystallin-positive Muskelfasern, • = benachbarte αBCrystallin-negative Muskelfasern.

Für eine Färbekontrolle wurde zudem eine Biopsie von einem neuromuskulär gesunden Patienten mitgefärbt. Abbildung 16 zeigt Ausschnitte von Färbungen dieser Kontrolle.

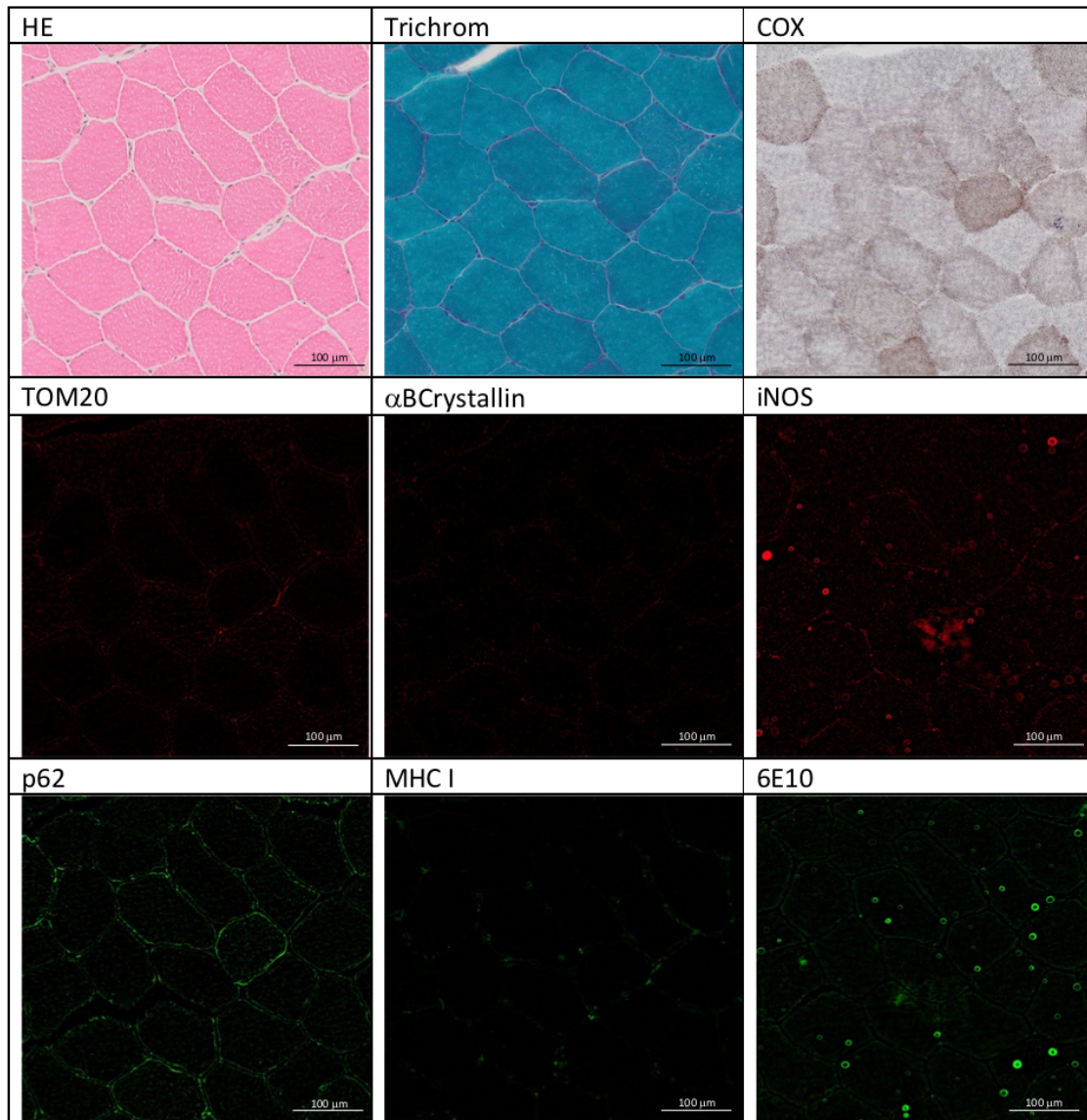


Abbildung 16: Färbekontrollen.

3.3.3 Quantitative Analyse der Einzelfasern

Zunächst wurde für die Einzelfaseranalyse erfasst, wie viele der $n = 100$ α BCrystallin-positiven bzw. -negativen Muskelfasern prozentual von den einzelnen Färbungen angefärbt wurden. Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Färbemuster genauer betrachtet und Multiparameteranalysen angefertigt.

In Abbildung 17 ist dargestellt, zu wie viel Prozent die einzelnen Marker, Atrophie und Hypertrophie in den α BCrystallin-positiven bzw. -negativen Einzelfasern vorlagen.

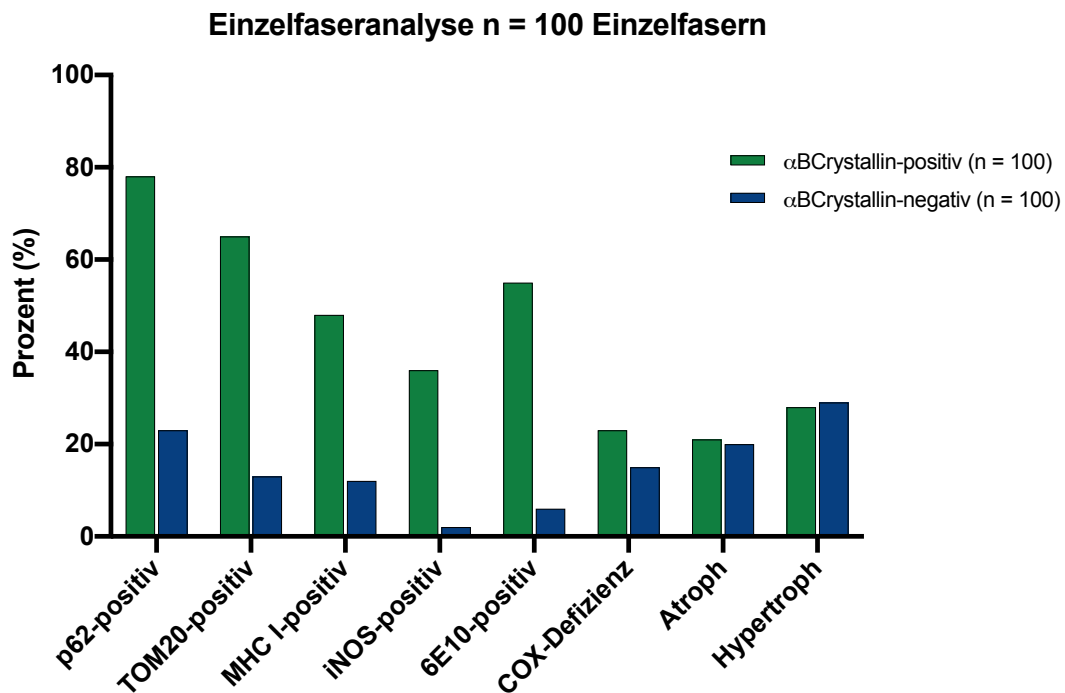


Abbildung 17: Prozentualer Vergleich der positiven Marker, Atrophie und Hypertrophie bei n = 100 α BCrystallin-positiven und n = 100 α BCrystallin-negativen Einzelfasern.

Insgesamt fällt bei Betrachten der Graphik auf, dass alle Marker in den α BCrystallin-positiven Einzelzellen prozentual stärker exprimiert waren. Bei COX-Defizienz zeigt sich kein großer Unterschied (23 % bei α BCrystallin-positiven Einzelfasern, 15 % bei α BCrystallin-negativen Einzelfasern), doch auch hier unterschied sich die Expression um 8 %. Der Faserdurchmesser, also der prozentuale Anteil von atrophen und hypertrophen Muskelfasern, jeweils bezogen auf das Patientengeschlecht, zeigte keinen nennenswerten Unterschied bezüglich α BCrystallin-Positivität und -Negativität.

Um näher zu untersuchen, welche Bedeutung der Faserdurchmesser hat, wurde analysiert, ob mit einer Atrophie bzw. Hypertrophie ein gehäuftes Auftreten eines Markers einherging. Es fiel auf, dass der Faserdurchmesser in Bezug auf COX eine interessante Verteilung zeigte:

Von den 21 atrophen α BCrystallin-positiven Einzelfasern hatten zehn eine COX-Defizienz; von den 28 hypertrophen α BCrystallin-positiven Muskelfasern hatten nur fünf ein COX-Defizit. Von den 20 α BCrystallin-negativen Einzelfasern mit Atrophie hatten neun eine COX-Defizienz; von den 29 hypertrophen α BCrystallin-negativen Einzelfasern hatte keine ein COX-Defizit.

Im Vergleich trat somit eher eine Atrophie der Muskelfasern mit einer COX-Defizienz zusammen auf, hingegen konnte bei den hypertrophen Muskelfasern deutlich weniger COX-Defizienz beobachtet werden.

Auch bezüglich p62 und Hypertrophie konnte ein vermeintlicher Zusammenhang festgestellt werden: Von den 78 p62-positiven α BCrystallin-positiven Muskelfasern zeigten 21, d. h. 26,9 % eine Hypertrophie. Von den 23 p62-positiven aber α BCrystallin-negativen Muskelfasern waren nur drei hypertroph, das entspricht 13 %. Also scheinen p62 und Hypertrophie in α BCrystallin-positiven Muskelfasern vermehrt gemeinsam aufzutreten.

Es wurden Korrelationsanalysen mit Spearman'schem Korrelationskoeffizient durchgeführt. Das Signifikanzniveau hierfür war $\alpha = 0,05$. In der ersten Korrelationsanalyse wurde das α BCrystallin-Färbeverhalten im Vergleich zu den einzelnen Färbungen betrachtet. In Tabelle 18 sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung inklusive p-Wert und Korrelationskoeffizient r angegeben.

Tabelle 18: Ergebnisse der Einzelfaser-Korrelationsanalyse des α BCrystallin-Färbeverhaltens.

Färbungen	Statistisch signifikant?	p-Wert	Korrelationskoeffizient r
α BCrystallin vs. p62	ja	$p = < 0,0001$	$r = 0,5500$
α BCrystallin vs. TOM20	ja	$p = < 0,0001$	$r = 0,5331$
α BCrystallin vs. MHC I	ja	$p = < 0,0001$	$r = 0,3928$
α BCrystallin vs. iNOS	ja	$p = < 0,0001$	$r = 0,4333$
α BCrystallin vs. 6E10	ja	$p = < 0,0001$	$r = 0,5321$
α BCrystallin vs. COX	nein	$p = 0,1508$	$r = 0,1020$
α BCrystallin vs. Atrophie	nein	$p = 0,8618$	$r = 0,01239$
α BCrystallin vs. Hypertrophie	nein	$p = 0,8763$	$r = -0,01108$

Es gibt somit mittelstark positive Zusammenhänge, also gute lineare Korrelation bezüglich α BCrystallin-Positivität bzw. -Negativität und p62-, TOM20- und 6E10-Anfärbung. Zudem gibt es einen schwächer positiven Zusammenhang zwischen α BCrystallin-Positivität und -Negativität und MHC I- und iNOS-Anfärbung.

Statistisch nicht signifikant hingegen waren α BCrystallin-Positivität bzw. -Negativität und COX-Defizienz, Atrophie und Hypertrophie bei der Einzelfaseranalyse.

In der zweiten Korrelationsanalyse wurden zwei Gruppen gebildet. So konnte sowohl bei den α BCrystallin-positiven Einzelfasern eine Korrelationsanalyse der Färbungen gegeneinander durchgeführt werden als auch bei den α BCrystallin-negativen Einzelfasern.

Um die Korrelationsanalysen beider Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurden sie zusammen in Tabelle 19 dargestellt. Angegeben sind die miteinander verglichenen Färbungen, das α BCrystallin-Färbeverhalten, das Vorliegen einer statistischen Signifikanz, der p-Wert sowie der Korrelationskoeffizient r.

Tabelle 19: Ergebnisse der Einzelfaser-Korrelationsanalyse der Färbungen gegeneinander.

Färbungen	α BCrystallin-Anfärbarkeit	Statistisch signifikant?	p-Wert	Korrelationskoeffizient r
p62 vs. TOM20	positiv	ja	p = 0,0002	r = 0,3695
	negativ	ja	p = 0,0336	r = 0,2127
p62 vs. MHC I	positiv	ja	p = 0,0013	r = 0,3170
	negativ	nein	p = 0,3696	r = 0,09067
p62 vs. iNOS	positiv	nein	p = 0,1448	r = 0,1469
	negativ	ja	p = 0,0086	r = 0,2614
p62 vs. 6E10	positiv	ja	p = < 0,0001	r = 0,4416
	negativ	nein	p = 0,1071	r = 0,1621
p62 vs. COX	positiv	nein	p = 0,2703	r = -0,1113
	negativ	nein	p = 0,0914	r = 0,1697
p62 vs. Atrophie	positiv	nein	p = 0,7166	r = 0,03675
	negativ	nein	p = 0,1571	r = 0,1426
p62 vs. Hypertrophie	positiv	nein	p = 0,6555	r = -0,04516
	negativ	nein	p = 0,0554	r = -0,1922
TOM20 vs. MHC I	positiv	ja	p = 0,0040	r = 0,2854
	negativ	ja	p = < 0,0001	r = 0,4063
TOM 20 vs. iNOS	positiv	nein	p = 0,1182	r = 0,1572
	negativ	nein	p = 0,1184	r = 0,1572
TOM20 vs. 6E10	positiv	ja	p = 0,0270	r = 0,2212
	negativ	nein	p = 0,7856	r = 0,02755
TOM20 vs. COX	positiv	nein	p = 0,9804	r = 0,002491
	negativ	nein	p = 0,1065	r = -0,1624

Färbungen	αBCrystallin-Anfärbbarkeit	Statistisch signifikant?	p-Wert	Korrelationskoeffizient r
TOM20 vs. Atrophie	positiv	nein	p = 0,4921	r = 0,06949
	negativ	nein	p = 0,7690	r = 0,02974
TOM20 vs. Hypertrophie	positiv	nein	p = 0,3091	r = -0,1027
	negativ	nein	p = 0,2505	r = -0,1160
MHC I vs. iNOS	positiv	ja	p = 0,0011	r = 0,3219
	negativ	nein	p = 0,6022	r = -0,05275
MHC I vs. 6E10	positiv	ja	p = < 0,0001	r = 0,3862
	negativ	nein	p = 0,7201	r = 0,03628
MHC I vs. COX-Defizienz	positiv	nein	p = 0,0555	r = -0,1922
	negativ	nein	p = 0,4955	r = -0,06895
MHC I vs. Atrophie	positiv	ja	p = 0,0455	r = -0,2005
	negativ	nein	p = 0,6484	r = 0,04616
MHC I vs. Hypertrophie	positiv	nein	p = 0,4918	r = 0,06954
	negativ	nein	p = 0,3204	r = -0,1004
iNOS vs. 6E10	positiv	ja	p = 0,0023	r = 0,3015
	negativ	ja	p = < 0,0001	r = 0,5654
iNOS vs. COX-Defizienz	positiv	nein	p = 0,1816	r = 0,1347
	negativ	nein	p = 0,5531	r = -0,06001
iNOS vs. Atrophie	positiv	nein	p = 0,7773	r = -0,02864
	negativ	nein	p = 0,4801	r = -0,07143
iNOS vs. Hypertrophie	positiv	nein	p = 0,3781	r = 0,08909
	negativ	nein	p = 0,3663	r = -0,09130
6E10 vs. COX-Defizienz	positiv	nein	p = 0,2095	r = -0,1266
	negativ	nein	p = 0,2933	r = -0,1061
6E10 vs. Atrophie	positiv	nein	p = 0,2308	r = 0,1209
	negativ	nein	p = 0,2104	r = -0,1263

Färbungen	α BCrystallin-Anfärbarkeit	Statistisch signifikant?	p-Wert	Korrelationskoeffizient r
6E10 vs. Hypertrophie	positiv	nein	p = 0,7908	r = 0,02686
	negativ	nein	p = 0,8117	r = 0,02413
COX-Defizienz vs. Atrophie	positiv	ja	p = 0,0023	r = 0,3016
	negativ	ja	p = < 0,0001	r = 0,4201
COX-Defizienz vs. Hypertrophie	positiv	nein	p = 0,4511	r = -0,07621
	negativ	ja	p = 0,0069	r = -0,2685

Grau markiert sind die Parameter der Korrelationsanalyse, bei denen eine statistische Signifikanz vorlag.

In dieser Korrelationsanalyse gab es nur bei den α BCrystallin-negativen Einzelfasern zwischen iNOS und 6E10 eine deutlich positive statistische Signifikanz. Zwischen den anderen Färbungen gab es keine oder weniger deutliche statistische Korrelationen. Weder zwischen TOM20 und COX-Defizienz, noch zwischen TOM20 und iNOS, noch zwischen iNOS und COX-Defizienz bestand eine statistische Signifikanz.

3.3.4 Morphologie der α BCrystallin-positiven Einzelfasern

Nur drei der 100 α BCrystallin-positiven Einzelfasern hatte eine normale Morphologie. Die anderen Muskelfasern wiesen internalisierte Zellkerne, Vakuolen, ein zerklüftetes Sarkolemm oder Anzeichen von Atrophie bzw. Hypertrophie auf.

Zwei der drei morphologisch normalen Einzelfasern waren p62-positiv, TOM20-positiv, MHC I-positiv, iNOS-positiv, 6E10-positiv und zeigten keine COX-Defizienz. Die andere Einzelfaser, die α BCrystallin-positiv und morphologisch unauffällig war, zeigte nur in der MHC I und in der 6E10-Färbung ein positives Fluoreszenzsignal und hatte ebenfalls keine COX-Defizienz.

3.3.5 Lokalisation des TOM20 Fluoreszenzsignals in α BCrystallin-positiven Einzelfasern

Von den 100 α BCrystallin-positiven Einzelfasern zeigten 65 auch ein Färbesignal in der TOM20-Fluoreszenzfärbung. Hierbei wurde untersucht, wo das TOM20-Fluoreszenzfärbesignal im Muskelfaserquerschnitt lokalisiert ist. In Abbildung 18 ist die prozentuale Verteilung der Morphologie des TOM20-Färbesignals dargestellt.

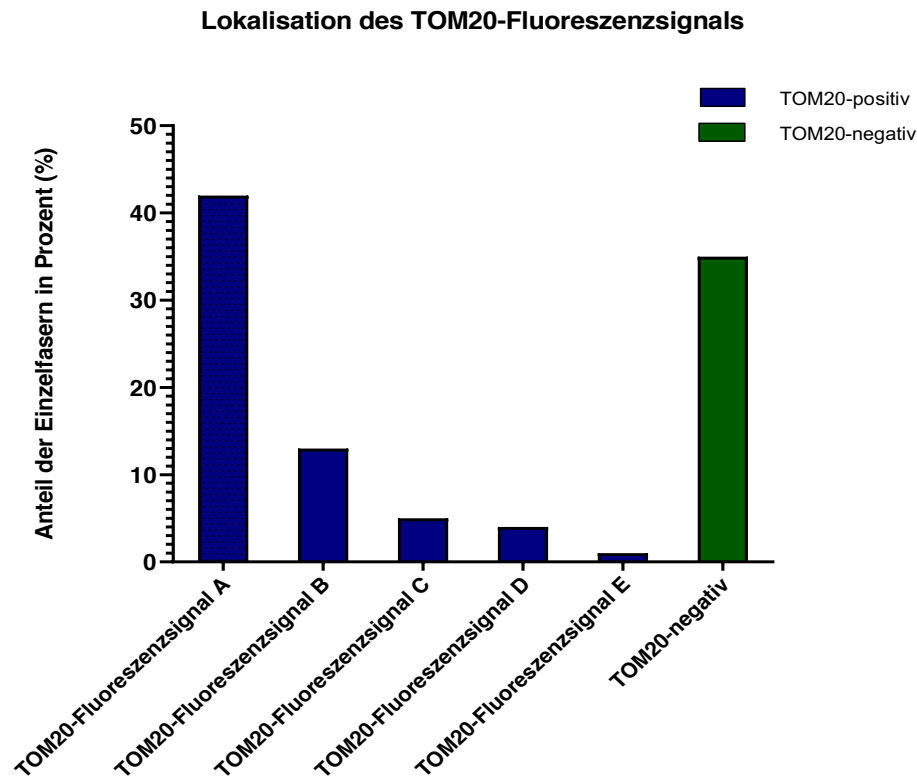


Abbildung 18: Prozentuale Verteilung der Lokalisation des TOM20-Fluoreszenzsignals in den n = 100 α BCrystallin-positiven Einzelfasern.

Die TOM20-positiven Muskelfasern zeigten verschiedene Färbeverhalten des Fluoreszenzsignals: A) ganzes Sarkoplasma mit Aussparung von Vakuolen bzw. Einschlüssen gefärbt, B) nur oder v. a. Einschlüsse gefärbt, C) unregelmäßige Färbung des Sarkoplasmas, D) hauptsächlich Sarkolemm gefärbt, E) insbesondere Sarkolemm und Einschlüsse gefärbt. Zum Vergleich wurde auch dargestellt, wie viel Prozent der n = 100 α BCrystallin-positiven Einzelfasern TOM20-negativ waren.

Von den 65 TOM20- und α BCrystallin-positiven Einzelfasern zeigten 42 Muskelfasern ein Fluoreszenzsignal im ganzen Sarkoplasma mit Aussparung von Vakuolen und Einschlüssen. Dies entspricht von den 65 doppelt-positiven Muskelfasern einem Prozentsatz von rund 64 % und ist somit die mit Abstand häufigste Verteilung des TOM20-Fluoreszenzsignals. Andere Lokalisationen des TOM20-Fluoreszenzsignals (beispielsweise Färbung der Einschlüsse bzw. Vakuolen, Färbung des Sarkolemm ohne Färbesignal des Sarkoplasmas etc.) waren bei deutlich weniger Muskelfasern zu sehen.

3.3.6 Multiparameteranalyse der α BCrystallin-positiven Einzelfasern

Bei der Analyse der n = 100 α BCrystallin-positiven Einzelfasern gab es Färbemuster, welche mehrfach vertreten waren. Dies bedeutet, dass mehrfach genau die gleiche Expression von Markern festgestellt wurde. Färbemuster, die bei mindestens fünf Muskelfasern identisch waren, sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Tabelle 20: Anzahl bzw. entsprechender Prozentwert des Färbemusters ausgehend von α BCrystallin-positiven Einzelfasern.

Anzahl bzw. entsprechender Prozentwert	Färbemuster
13x d. h. 13 %	α BCrystallin-positiv, p62-positiv, TOM20-positiv, MHC I-positiv, iNOS-positiv, 6E10-positiv, COX-Defizienz-negativ
9x d. h. 9 %	α BCrystallin-positiv, p62-positiv, TOM20 positiv, MHC I-positiv, iNOS-negativ, 6E10-positiv, COX-Defizienz-negativ
8x d. h. 8 %	außer α BCrystallin alle Marker negativ d. h. α BCrystallin-positiv, p62-negativ, TOM20-negativ, MHC I-negativ, iNOS-negativ, 6E10-negativ, COX-Defizienz-negativ
7x d. h. 7 %	α BCrystallin-positiv, p62-positiv, TOM20-positiv, MHC I-negativ, iNOS-negativ, 6E10-positiv, COX-Defizienz-negativ
7x d. h. 7 %	α BCrystallin-positiv, p62-positiv, TOM20-positiv, MHC I-negativ, iNOS-negativ, 6E10-negativ, COX-Defizienz-negativ
6x d. h. 6 %	α BCrystallin-positiv, p62-positiv, TOM20-positiv, MHC I-positiv, iNOS-negativ, 6E10-negativ, COX-Defizienz-negativ
5x d. h. 5 %	α BCrystallin-positiv, p62-positiv, TOM20-negativ, MHC I-negativ, iNOS-negativ, 6E10-positiv, COX-Defizienz-negativ

In die Tabelle aufgenommen wurden nur Färbemuster, die mindestens fünfmal vorhanden waren.

In Abbildung 19 sind in einem Flussdiagramm die Färbemuster der α BCrystallin-positiven Einzelfasern dargestellt. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit sind in dieser Abbildung nur die 78 Muskelfasern dargestellt, die p62-positiv waren.

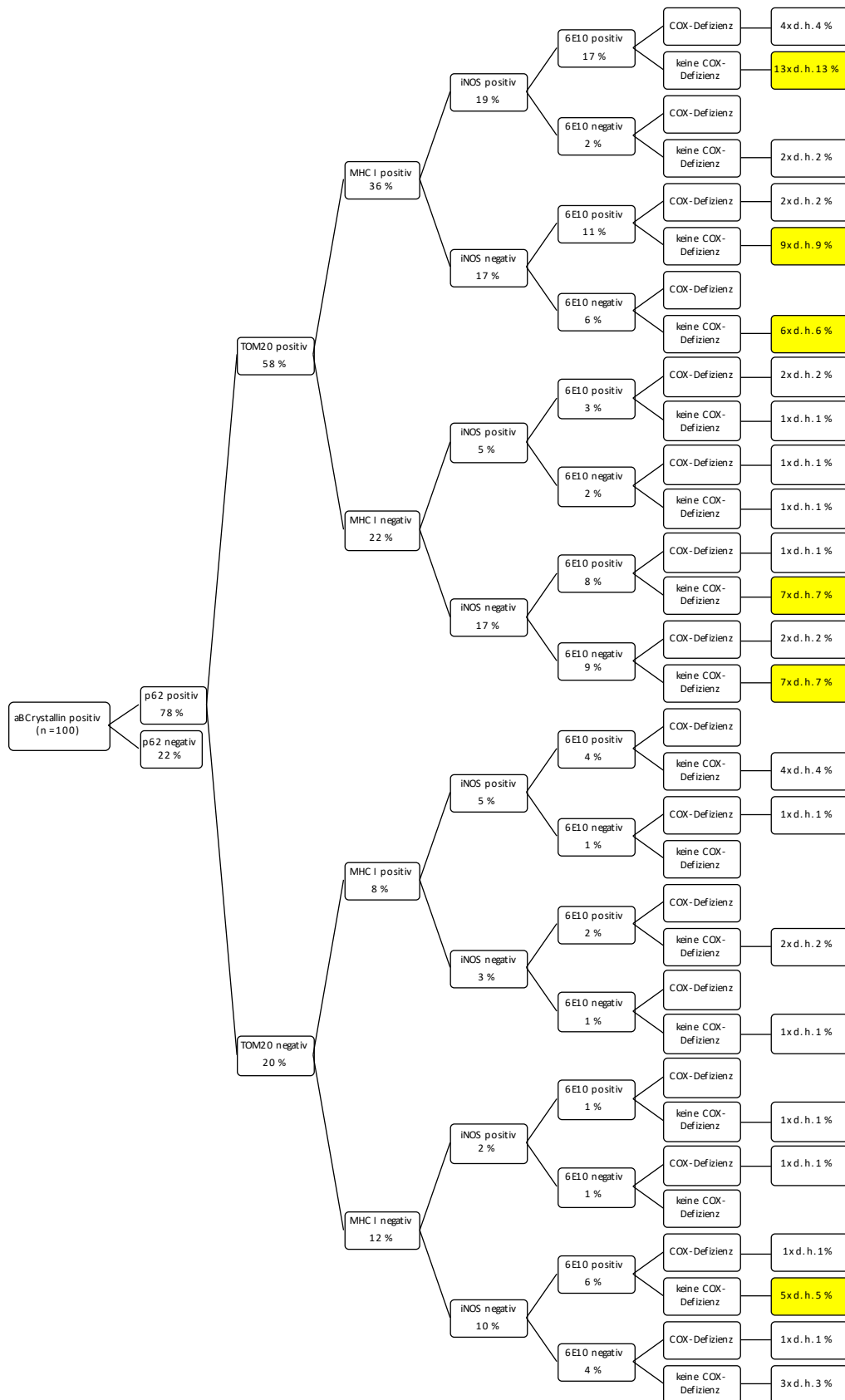


Abbildung 19: Flussdiagramm der αBcrystallin-positiven Einzelfasern.

Um eine übersichtliche Darstellung zu gewährleisten wurden von den n = 100 αBcrystallin-positiven Einzelfasern nur die 78 p62-positiven Muskelfasern in diesem Flussdiagramm dargestellt. Färbemuster, die von mindestens fünf Muskelfasern gleich exprimiert wurden, sind gelb markiert.

Hervorzuheben ist, dass 13 % der α BCrystallin-positiven Muskelfasern p62-positiv, TOM20-positiv, MHC I-positiv, iNOS-positiv, 6E1-positiv, COX-Defizienz-negativ waren und 9 % der α BCrystallin-positiven Einzelfasern sich von dem genannten Färbemuster nur durch eine iNOS-Negativität unterschieden. Betrachtet man diese Färbemuster nun gemeinsam und ließe iNOS unberücksichtigt, so ließ sich feststellen, dass 22 % der α BCrystallin-positiven Einzelfasern p62-positiv, TOM20-positiv, MHC I-positiv und 6E10-positiv waren und keine COX-Defizienz aufwiesen.

Lässt man zusätzlich zu iNOS noch 6E10 außer Betracht, dann waren von den $n = 100$ α BCrystallin-positiven Einzelfasern 30 Muskelfasern p62-positiv, TOM20-positiv, MHC I-positiv und hatten keine COX-Defizienz.

Ein weiteres Färbemuster, das häufig vorlag, war p62-positiv, TOM20-positiv, MHC I-negativ, iNOS-negativ und keine COX-Defizienz. Dieses Färbemuster fand sich bei 14 der 100 α BCrystallin-positiven Einzelfasern. Von diesen 14 Muskelfasern waren sieben 6E10-positiv und sieben 6E10-negativ.

Acht der 100 α BCrystallin-positiven Einzelfasern waren für alle anderen Marker negativ, d. h. p62-negativ, TOM20-negativ, MHC I-negativ, iNOS-negativ, 6E10-negativ und keine COX-Defizienz. Alle acht dieser Muskelfasern zeigten dennoch eine veränderte Morphologie, d. h. sie hatten internalisierte Zellkerne, Vakuolen oder sahen aufgrund von zerklüfteten Zellrändern geschädigt aus.

3.3.7 Multiparameteranalyse der α BCrystallin-negativen Einzelfasern

Auch bei der Analyse der $n = 100$ α BCrystallin-negativen Einzelfasern gab es wiederholt auftretende Färbemuster. In Tabelle 21 sind die Färbemuster aufgelistet, die bei wenigstens fünf Muskelfasern identisch waren.

Tabelle 21: Anzahl bzw. entsprechender Prozentwert des Färbemusters ausgehend von α BCrystallin-negativen Einzelfasern.

Anzahl bzw. entsprechender Prozentwert	Färbemuster
54x d. h. 54 %	alle Marker negativ, d. h. α BCrystallin-negativ, p62-negativ, TOM20-negativ, MHC I-negativ, iNOS-negativ, 6E10-negativ, COX-Defizienz-negativ
9x d. h. 9 %	α BCrystallin-negativ, p62-negativ, TOM20-negativ, MHC I-negativ, iNOS-negativ, 6E10-negativ, COX-Defizienz-positiv
9x d. h. 9 %	α BCrystallin-negativ, p62-positiv, TOM20-negativ, MHC I-negativ, iNOS-negativ, 6E10-negativ, COX-Defizienz-negativ
5x d. h. 5 %	α BCrystallin-negativ, p62-positiv, TOM20-negativ, MHC I-negativ, iNOS-negativ, 6E10-negativ, COX-Defizienz-positiv

In die Tabelle aufgenommen wurden nur Färbemuster, die mindestens fünfmal vorhanden waren.

Die Abbildung 20 zeigt in einem Flussdiagramm die Färbemuster der α BCrystallin-negativen Einzelfasern. Um das Flussdiagramm übersichtlicher zu gestalten, sind nur die 77 Muskelfasern dargestellt, die p62-negativ waren.

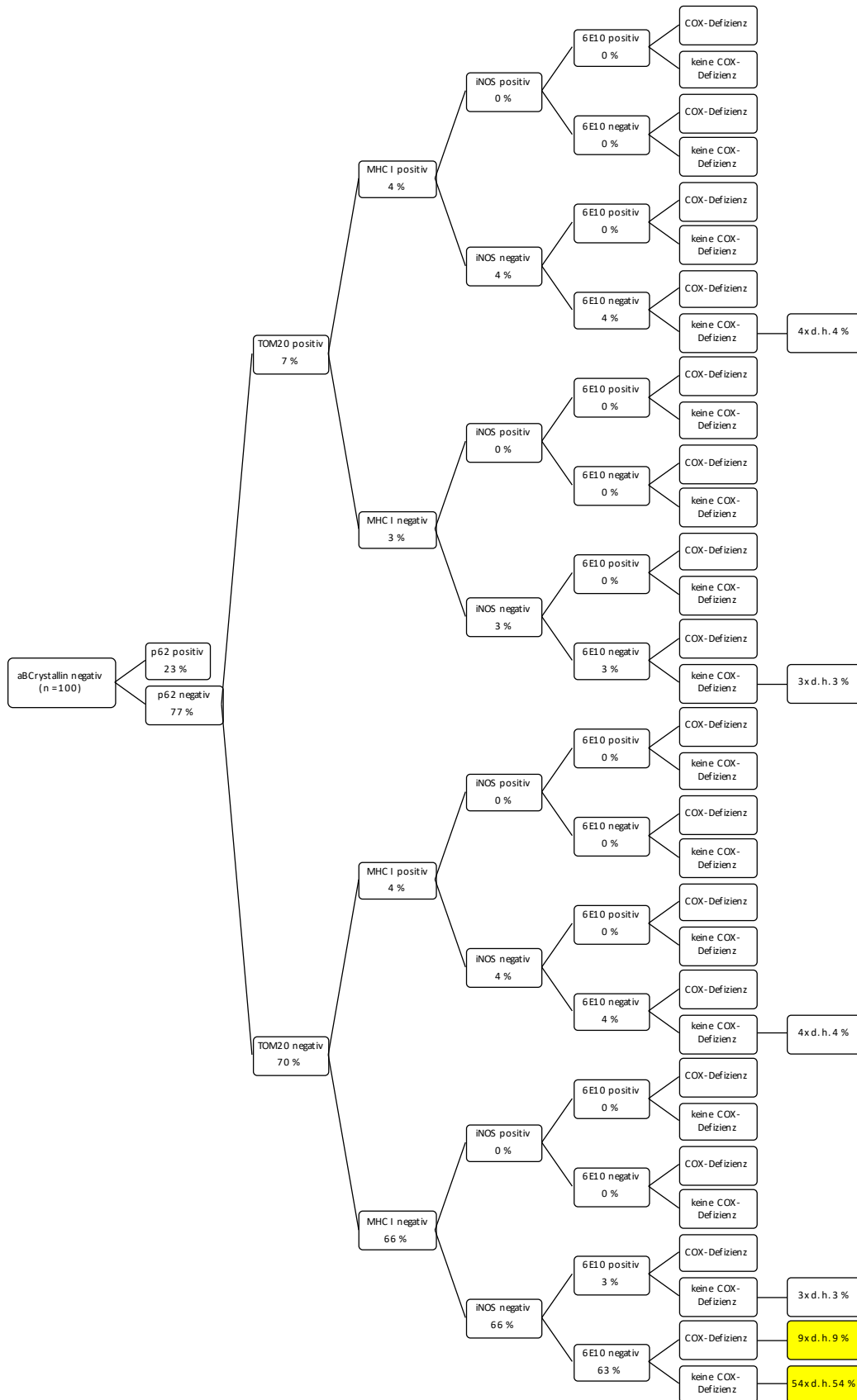


Abbildung 20: Flussdiagramm der αB-Crystallin-negativen Einzelfasern.

Um eine übersichtliche Darstellung zu gewährleisten wurden von den n = 100 αB-Crystallin-negativen Einzelfasern nur die 77 p62-negativen Muskelfasern in diesem Flussdiagramm dargestellt. Die Färbemuster, die von mindestens fünf Muskelfasern gleich exprimiert wurden, sind gelb markiert.

Über die Hälfte (54 %) der α BCrystallin-negativen Einzelfasern waren in allen Färbungen negativ angefärbt, d. h. α BCrystallin-negativ, p62-negativ, TOM20-negativ, MHC I-negativ, iNOS-negativ, 6E10-negativ und keine COX-Defizienz.

Lässt man die beiden Marker p62 und COX außer Betracht, sind 77 der 100 Einzelfasern α BCrystallin-negativ, TOM20-negativ, MHC I-negativ, iNOS-negativ und 6E10-negativ.

3.3.8 Zweistufige Multiparameteranalyse der α BCrystallin-positiven und α BCrystallin-negativen Einzelfasern

Als weitergehende Untersuchung der simultanen Expression der Marker wurde eine zweistufige prozentuale Quantifizierung vorgenommen. Hierbei wurde ausgehend von den $n = 100$ α BCrystallin-positiven Einzelfasern jeweils bestimmt, wie viel Prozent der Einzelfasern für die sechs Immunfärbungen positiv war. Dann wurde von den positiven Fasern dieser Färbung ausgehend betrachtet, wie viel Prozent in einer zweiten Färbung positiv waren. Beispielsweise waren von den $n = 100$ α BCrystallin-positiven Einzelzellen 78, d. h. 78 % p62-positiv. Von diesen 78 % waren wiederum 73,4 % auch TOM20-positiv, 56,4 % auch MHC I-positiv, 39,7 % auch iNOS-positiv, 66,7 % auch 6E10-positiv und 20,5 % hatten eine COX-Defizienz.

Für die $n = 100$ α BCrystallin-negativen Einzelfasern wurde entsprechend genauso vorgegangen.

Zur besseren Veranschaulichung wurde jeweils ein Flussdiagramm erstellt, das die Prozentzahlen der zweistufigen Quantifizierung angibt. Hierbei wurden die Kästchen mit einer Farbschattierung, die der Prozentzahl entspricht, eingefärbt. Die Farbschattierung wurde in 25 %-Schritten vorgenommen, d. h. sehr hell = 0-25 %, hell = 26-50 %, dunkel = 51-75 %, sehr dunkel = 76-100 %. Abbildung 21 und Abbildung 22 zeigen diese beiden Flussdiagramme.

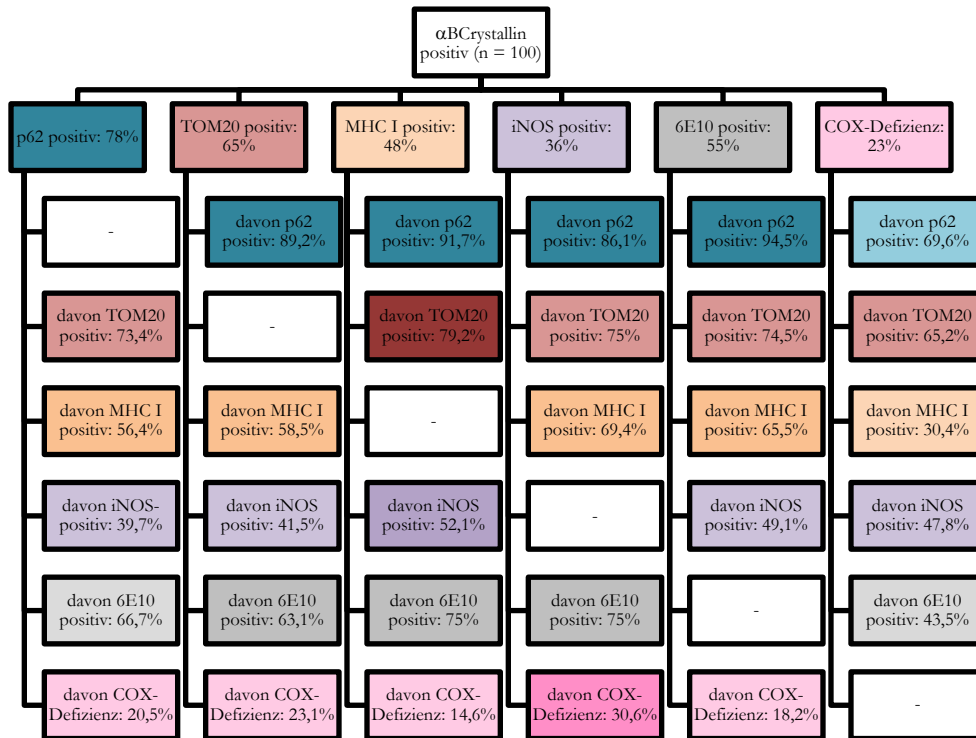


Abbildung 21: Zweistufige prozentuale Auswertung der n = 100 αBCrystallin-positiven Einzelfasern.

Ausgehend von den 100 αBCrystallin-positiven Muskelfasern ist in der ersten Stufe angegeben, zu welchem Anteil die αBCrystallin-positiven Fasern auch für einen zweiten der sechs weiteren Marker positiv waren. In der zweiten Stufe wird (ausgehend von Positivität in der ersten Stufe) angegeben, wie viele der Einzelfasern auch in einer dritten Färbung positiv gefärbt waren. Die Farbschattierung entspricht der Prozentzahl (sehr hell = 0-25 %, hell = 26-50 %, dunkel = 51-75 % und sehr dunkel = 76-100 %).

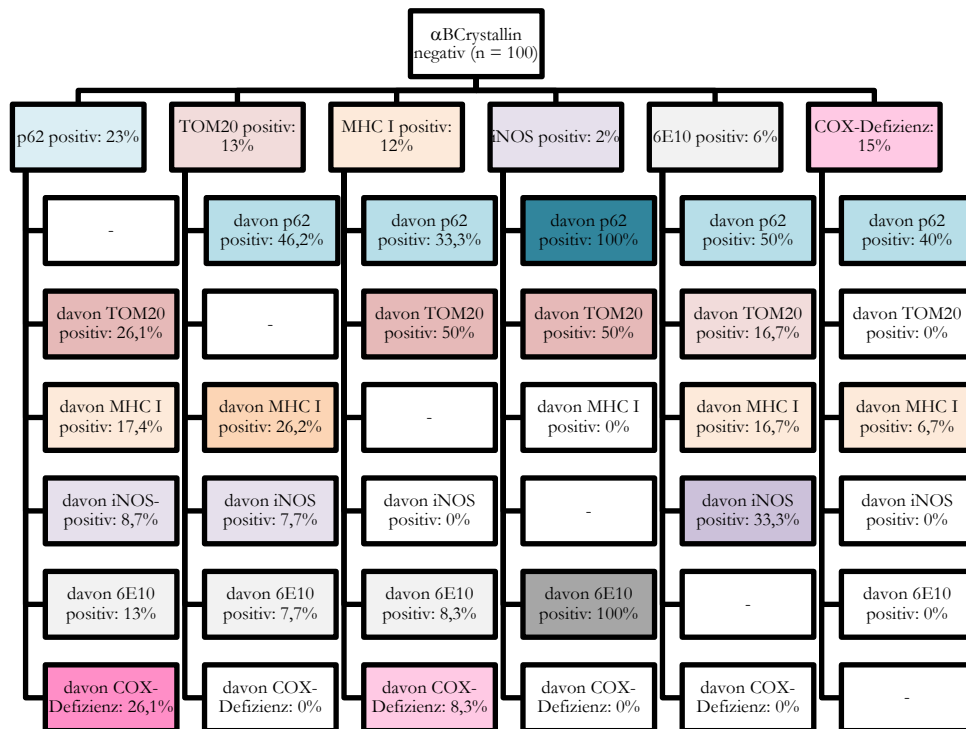


Abbildung 22: Zweistufige prozentuale Auswertung der n = 100 α BCrystallin-negativen Einzelfasern.

Von den 100 α BCrystallin-negativen Fasern ausgehend ist in der ersten Stufe des Flussdiagramms angegeben, zu welchem Anteil die α BCrystallin-negativen Muskelfasern für eine der sechs weiteren Färbungen positiv waren. In der zweiten Stufe wird (ausgehend von Positivität in der ersten Stufe) angegeben, wie viele der Einzelfasern auch in einer zweiten Färbung positiv gefärbt waren. Die Farbschattierung entspricht der Prozentzahl (sehr hell = 0-25 %, hell = 26-50 %, dunkel = 51-75 % und sehr dunkel = 76-100 %).

Beim Vergleich der beiden Abbildungen fiel schon im Hinblick auf die Farbschattierung auf, dass das Flussdiagramm der α BCrystallin-positiven Einzelfasern deutlich dunklere Farbschattierungen beinhaltete. Beim genaueren Betrachten der Prozentwerte konnte man im Vergleich sehen, dass bei den meisten Färbungen deutlich höhere Prozentzahlen erreicht wurden, wenn von einer α BCrystallin-positiven Einzelzelle ausgegangen wurde. Bemerkenswert in dieser zweistufigen Analyse waren folgende Aspekte:

3.3.8.1 Koexpression

Die höchste Rate an Koexpression zeigte p62. Bei einer Färbepositivität in der ersten Stufe waren in der zweiten Stufe 69,6 % bis 94,5 % der Muskelfasern auch für p62-positiv. Die zweithöchste Rate an Koexpression lag für TOM20 vor. 65,2 % bis 79,2 % der in der ersten Stufe positiven Muskelfasern zeigten auch eine erhöhte TOM20-Expression.

3.3.8.2 COX

In der zweiten Stufe erreichte die COX-Defizienz nur bei iNOS-positiven Muskelfasern einen Anteil von über 30 %. Bei den anderen Färbungen hatten bei einer Positivität in der ersten Stufe nur maximal 23,1 % der Muskelfasern auch eine COX-Defizienz. Von COX-

defizienten Muskelfasern ausgehend war der Anteil anderer positiven Färbungen deutlich höher. Das bedeutet, dass bei einer Hochregulation von p62, TOM20, MHC I, iNOS oder 6E10 eine COX-Defizienz eher seltener war. Bei Vorliegen einer COX-Defizienz war hingegen ein größerer Anteil auch in anderen Färbungen positiv. Insgesamt war die Rate an Koexpression eines anderen Markers bei COX-defizienten Fasern vergleichsweise niedriger als bei den anderen Färbungen.

3.3.8.3 TOM20 und COX

Auch wenn sowohl TOM20-Positivität als auch COX-Defizienz eine mitochondriale Schädigung anzeigen, waren dennoch diese beiden Marker nur in einem kleinen Teil der Einzelfasern gleichzeitig exprimiert. Von den 65 TOM20-positiven α BCrystallin-positiven Einzelfasern zeigten nur 15 eine COX-Defizienz; von den 13 TOM20-positiven α BCrystallin-negativen Muskelfasern hatte keine Faser eine COX-Defizienz vorliegen.

3.3.8.4 TOM20 und p62

Bei 58 der 100 α BCrystallin-positiven Einzelfasern waren sowohl p62 als auch TOM20 hochreguliert; dies trifft nur auf sechs der 100 α BCrystallin-negativen Einzelfasern zu.

3.3.8.5 6E10 und p62

Sowohl p62 als auch 6E10 sind Marker für eine Proteindegeneration und -Akkumulation. Ausgehend von α BCrystallin-positiven Muskelfasern waren 66,7 % p62-positiven Fasern auch 6E10-positiv und 94,5 % der 6E10-positiven Muskelfasern auch p62-positiv angefärbt. Insgesamt zeigten 52 der 100 α BCrystallin-positiven Muskelfasern sowohl für p62 als auch für 6E10 eine Hochregulation. Diese zeitgleiche Koexpression deutet auf vielfältige Prozesse der Proteinakkumulation hin. Nur drei der 100 α BCrystallin-negativen Einzelfasern waren sowohl für p62 als auch für 6E10-positiv angefärbt.

3.3.8.6 iNOS und MHC I

Es waren 36 der 100 α BCrystallin-positiven Einzelfasern iNOS-positiv – bei den α BCrystallin-negativen waren es nur zwei der 100 Einzelfasern.

In den α BCrystallin-positiven Einzelfasern war eine vermehrte iNOS-Hochregulation prozentual am häufigsten in MHC I-positiven Muskelfasern zu finden; andererseits trat auch eine verstärkte MHC I-Expression prozentual am häufigsten in iNOS-positiven Muskelfasern zusammen auf. So zeigten von den 100 α BCrystallin-positiven Muskelfasern 48 eine vermehrte MHC I-Expression und 36 eine iNOS-Hochregulation; 25 der 100 Einzelfasern exprimierten beide Marker gleichzeitig.

4 Diskussion

Bei der Einschlusskörpermyositis handelt es sich zwar um die häufigste idiopathische inflammatorische Myopathie bei über 50-Jährigen, doch durch die teilweise unspezifischen Symptome und den chronisch-progredienten Krankheitsverlauf über viele Jahre hinweg ist die Diagnose oft erschwert. Durch die Muskelschwäche kommt es zu immer mehr Einschränkungen im Alltag und einer zunehmenden Minderung der Lebensqualität. Bisher sind die Pathomechanismen, die zu der IBM führen, noch nicht vollends verstanden, was die Suche nach einem erfolgreichen Therapiekonzept erschwert (Schmidt und Schmidt 2017).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die histopathologischen Merkmale der Einschlusskörpermyositis mit besonderem Augenmerk auf die Zellstressparameter zu untersuchen. Der Zusammenhang der histopathologischen Auffälligkeiten und Marker ist relevant für das Verständnis der molekularen Mechanismen, die zur Krankheitsentstehung und -Aufrechterhaltung führen bzw. den chronisch-progredienten Verlauf bedingen. Mit drei verschiedenen Methoden wurden die histopathologischen Prozesse der IBM dargestellt und analysiert.

In diesem Abschnitt werden die drei methodischen Ansätze jeweils in Bezug auf ihre Aussagekraft diskutiert und in die wissenschaftliche Literatur eingeordnet. Die Fallstudie und die Einzelfaseranalyse werden gemeinsam betrachtet und miteinander in Zusammenhang gebracht.

4.1 Fallstudie und Einzelfaseranalyse

4.1.1 Besondere Bedeutung der Fallstudie und Einzelfaseranalyse

Das posthum entnommene Muskelgewebe eines bekannten IBM-Patienten ist eine außergewöhnliche Möglichkeit, um einen Einblick in das Zusammenspiel histopathologischer Marker mit dem klinischen Erscheinungsbild zu bekommen. Generell wird eine Biopsie nur entnommen, um den Verdacht auf eine IBM-Diagnose zu bestätigen bzw. eine genaue Einordnung in die Gruppe der Myositiden zu ermöglichen. Eine weitere Biopsie im Krankheitsverlauf ist unüblich, insbesondere nicht von mehreren Muskeln gleichzeitig. Die während der Obduktion entnommenen Muskelgewebeproben des Patienten bieten eine Gelegenheit, eine Verbindung zwischen den Symptomen wie z. B. Muskelschwäche und molekularen Zeichen von Inflammation und Degeneration herzustellen. Auch die Verknüpfung der histopathologischen Parameter miteinander auf Grundlage mehrerer Muskeln statt nur einer Biopsie kann abbilden, wie die IBM sich zu einem definierten Zeitpunkt an mehreren Lokalisationen im Körper präsentiert.

Die Einzelfaseranalyse ist eine passende Ergänzung zur Fallstudie, da hierbei analysiert werden konnte, welche Marker simultan in der gleichen Muskelzelle exprimiert waren. Somit können beide Aspekte gemeinsam betrachtet werden: Einerseits die Expression der immunhistochemischen Marker in verschiedenen Muskeln eines Patienten inklusive ihrer klinischen

Symptomatik; andererseits die zeitgleiche Expression auf Einzelfaserebene von vier verschiedenen IBM-Patienten.

4.1.2 Atrophie und Muskelkraft

Alle 14 Muskelproben der Fallstudie zeigten histopathologische Auffälligkeiten. Es lag in allen Proben mehr Bindegewebe und mehr Fett als in gesundem Muskelgewebe vor und der Atrophiefaktor war in unterschiedlich starkem Ausmaß in allen Proben erhöht (siehe Tabelle 14). Bei der Routinediagnostik der IBM wird lediglich eine Biopsie entnommen, sodass keine Aussage über den Grad der Atrophie auf mikroskopischer Ebene in den anderen Muskeln gemacht werden kann. In einer MRT-Studie von 2017 wurde bei zwölf IBM-Patienten eine MRT-Untersuchung der oberen und unteren Extremität durchgeführt (Guimaraes et al. 2017). Bei jedem Patienten wurden 64 Muskeln bezüglich Atrophie, Fettinfiltration und Ödemen untersucht. Bei elf der zwölf Patienten lag eine muskuläre Atrophie vor. Im Mittel waren 38 von den 64 untersuchten Muskeln (d. h. 59,38 %) von Atrophie betroffen (*range*: 0-58). Zudem korrelierten Muskelschwäche und Atrophie in der MRT-Studie miteinander.

Die Atrophie in allen 14 untersuchten Muskeln des Fallstudien-Patienten in Zusammenschau mit der MRT-Studie lässt vermuten, dass bei IBM im Krankheitsverlauf der Großteil der Muskeln von Atrophie betroffen ist. Auch klinisch unauffällige Muskeln in der MRC-Muskelkrafttestung (Compston 2010) waren bei dem Patienten im histologischen Präparat von Atrophie betroffen. Dies beruht wahrscheinlich darauf, dass – wie schon berichtet (Hilton-Jones und Brady 2016) – die manuelle Muskelkrafttestung, z. B. MRC-Kraftgrad oder Kraftgrad nach Janda, keine zuverlässige Methode ist, um die Muskelkraft zu testen. So wird beschrieben, dass es bei KG > 3/5 zu einem Deckeneffekt mit reduzierter Sensitivität kommt (Rider et al. 2011). Dies ist zurückzuführen auf das Eigengewicht der Extremitäten des Patienten und der Stärke des Untersuchers, die eine geringe Schwäche unentdeckt lassen können. Auch die Kompensation durch synergistische Muskeln bzw. die Testung funktioneller Muskelgruppen anstelle einzelner Muskeln können das Ergebnis verfälschen.

Es muss beachtet werden, dass der Begriff „Atrophie“ sich MR-morphologisch und in der klinischen Untersuchung auf ein verringertes makroskopisches Volumen bzw. Umfang bezieht, dies kann sowohl aus einer reduzierten Muskelfaseranzahl als auch Muskelfaserdurchmesser resultieren. Histopathologisch hingegen bezeichnet eine Atrophie einen verringerten Muskelfaserdurchmesser. Dies erschwert es, die klinische Untersuchung, MRT-Untersuchungsergebnisse und die Histopathologie miteinander zu vergleichen.

4.1.3 Hypertrophie und p62

In den Muskelproben des Patienten der Fallstudie konnte zudem ein möglicher Zusammenhang zwischen Muskelfaser-Hypertrophie und vermehrter p62-Expression festgestellt werden (siehe Kapitel 3.1.6). In einer Studie wurden kultivierte Kardiomyozyten oxidativem Stress in Form von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) ausgesetzt, wodurch es zu einer gesteigerten

p62-Expression d. h. zu einer gestörten Protein-Autophagie kam (Wang JP et al. 2018). Der oxidative Stress bewirkte an den Kardiomyozyten zudem eine Hypertrophie und die Autoren der Studie stellten die Hypothese auf, dass eine reduzierte Autophagie, detektierbar u. a. durch p62-Positivität, zu kardialer Hypertrophie führt.

In der Einzelfaseranalyse zeigte sich, dass prozentual deutlich mehr p62-positive Muskelfasern mit Hypertrophie in α BCrystallin-positiven statt -negativen Muskelfasern zu finden waren (siehe Kapitel 3.3.3). Dies passt zu der Hypothese der oben genannten Studie, dass Stress – in der Studie von Wang JP et al. (2018) in Form von H_2O_2 , in der vorliegenden Arbeit abgeleitet aus α BCrystallin-Positivität – zu vermehrter p62-Expression und dies wiederum zu Hypertrophie führt. Doch da in der Einzelfaseranalyse nur ein Viertel der α BCrystallin- und p62-positiven Muskelfasern eine Hypertrophie zeigte, kann für diesen hypothetischen Zusammenhang zwar eine Tendenz beobachtet werden, aber die vorliegenden Ergebnisse lassen keine grundsätzliche Aussage zu.

Die Studie von Wang JP et al. (2018) wurde zwar an Kardiomyozyten durchgeführt, würde sich aber auf die histopathologischen Merkmale der IBM übertragen lassen. Bei der Fallstudie kann ein Zusammenhang zwischen p62 und Hypertrophie angenommen werden, die Einzelfaseranalyse (siehe Kapitel 3.3.3) zeigt, dass dies insbesondere in α BCrystallin-positiven Muskelfasern anzunehmen ist. Diese Prozesse von Zellstress, Proteinakkumulation und Hypertrophie spielen vermutlich gemeinsam eine Rolle der Entstehung von Myodegeneration bei der IBM.

4.1.4 α BCrystallin-Positivität und -Negativität in der Einzelfaseranalyse

In der Einzelfaseranalyse von jeweils $n = 100$ Einzelfasern konnte die Expression verschiedener Marker in Bezug auf α BCrystallin-Positivität und -Negativität untersucht werden. Es ist beim Betrachten der Abbildung 17 offensichtlich, dass alle Marker in den α BCrystallin-positiven Einzelfasern prozentual mehr exprimiert waren als in den α BCrystallin-negativen Muskelfasern. Für die Marker p62, TOM20, MHC I, iNOS und 6E10 liegen in der Einzelfaseranalyse statistisch signifikante Korrelationen bezüglich α BCrystallin vor. Dies zeigt, dass Zellstress mit den anderen Prozessen der Pathogenese der IBM (Inflammation, Proteinakkumulation und Myodegeneration) in engem Zusammenhang steht und möglicherweise eine Schlüsselrolle spielen könnte, so wie schon von Muth et al. (2009) vermutet.

Von den 100 α BCrystallin-negativen Muskelfasern (siehe Tabelle 21) waren bei 54 Fasern alle Marker negativ, (d. h. p62-negativ, TOM20-negativ, MHC I-negativ, iNOS-negativ, 6E10-negativ, COX-Defizienz-negativ). Von den 100 α BCrystallin-positiven Muskelfasern (siehe Tabelle 20) waren hingegen nur acht Fasern für alle Marker negativ. Diese acht Muskelfasern zeigten aber trotzdem eine abnorme Morphologie, d. h. sie hatten Vakuolen, internalisierte Zellkerne o. ä. Insgesamt hatten von den 100 α BCrystallin-positiven Muskelfasern nur drei Fasern eine normale Morphologie und könnten als *x-fibers* bezeichnet werden

(Banwell und Engel 2000), diese drei waren aber trotzdem positiv für immunhistochemische Marker.

Bei der Auswertung der Einzelfaseranalyse zeigte sich, dass einige Färbemuster gehäuft auftraten. Dies deutet darauf hin, dass die entsprechenden Marker des Färbemusters Prozesse widerspiegeln, die sich zeitgleich in den Muskelfasern abspielen. Betrachtet man ausgehend von α BCrystallin-positiven Einzelfasern (siehe Kapitel 3.3.6) alle sechs Marker, so ist das häufigste Muster folgendes: p62-positiv, TOM20-positiv, MHC I-positiv, iNOS-positiv, 6E10-positiv, COX-Defizienz negativ. Dieses Muster wurde von 13 Muskelfasern exprimiert. Lässt man die beiden prozentual am wenigsten vertretenen Marker iNOS und COX-Defizit außer Betracht, so liegt das Muster p62-positiv, TOM20-positiv, MHC I-positiv und 6E10-positiv bei 28 von 100 α BCrystallin-positiven Muskelfasern vor. Dies bestätigt erneut die oben genannte Hypothese von Muth et al. (2009), dass Zellstress, Inflammation (MHC I), Proteinakkumulation und die Degeneration der Muskelfaser eng miteinander zusammenhängen. Des Weiteren scheint eine TOM20-Hochregulation und die damit verbundenen mitochondrialen Abnormitäten ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese der IBM zu spielen (s. u.).

4.1.5 p62, 6E10 und α BCrystallin

Das Protein p62 ist sowohl protektiv in die Prozesse von Zellüberleben als auch in die pathologischen Prozesse, die zum Zelluntergang führen, involviert. Es wird als histochemischer Marker für Proteinakkumulation genutzt, die zur Amyloidentstehung führen kann. Auch α BCrystallin scheint ein Marker für nachfolgende Proteinakkumulation zu sein: In einer Studie wurde gezeigt, dass eine vermehrte Expression mit einer Akkumulation von β -Amyloid d. h. 6E10 einhergeht. Hieraus wurde die Vermutung aufgestellt, dass ein gesteigertes Vorkommen von α BCrystallin der β -Amyloid-Akkumulation vorausgehen könne (Muth et al. 2009). Somit wäre eine α BCrystallin-Anfärbung Anzeichen für eine nachfolgende Proteinakkumulation bzw. Amyloid-Ablagerung – wie auch p62.

Auch in den Muskelproben der Fallstudie und in den Biopsien der Einzelfaseranalyse war ein Zusammenhang zwischen α BCrystallin und p62 erkennbar und würde die Vermutung von Muth et al. (2009) aus der o. g. Studie bestätigen. Bei dem IBM-Patienten der Fallstudie hatten alle sechs Muskelproben mit p62-Hochregulation einen Anteil von über 15 % α BCrystallin-positiven Fasern (siehe Abbildung 4). In der Einzelfaseranalyse lagen sowohl für p62- als auch für 6E10-Expression bezüglich α BCrystallin-Positivität statistisch signifikante Zusammenhänge in der Korrelationsanalyse vor (siehe Tabelle 18). Von den 100 α BCrystallin-positiven Einzelfasern hatten 52 sowohl für p62 als auch für 6E10 eine verstärkte Expression. Bei den 100 α BCrystallin-negativen Muskelfasern zeigten nur drei sowohl für p62 als auch für 6E10 eine Hochregulation.

Das simultane Vorhandensein der drei Marker könnte bedeuten, dass sie im gleichen Stadium der Pathogenese beteiligt und damit nachweisbar sind. Dies würde zu der Hypothese passen, dass α BCrystallin wie auch p62 eine Rolle bei den Mechanismen der Proteinakkumulation, beispielsweise in Form von 6E10 d. h. β -Amyloid, spielt und die beiden Marker miteinander einhergehen.

Des Weiteren ist α BCrystallin als Hitzeschock-Protein ein Zellstress-Marker. Auch für p62 wurde (an peritonealen Makrophagen von Mäusen) gezeigt, dass vermehrter oxidativer Stress eine Induktion der p62-mRNA bewirkt (Ishii et al. 1996). Somit scheinen p62 und α BCrystallin nicht nur bei Proteinakkumulation mitzuwirken, sondern die Expression beider Marker wird durch Zellstress stimuliert. Auch diese Verknüpfung passt zu dem Auftreten beider Marker in den sechs p62-positiven Muskelproben der Fallstudie (siehe Abbildung 4). In der Einzelfaseranalyse war p62 sogar der Marker, der die höchste Koexpression mit α BCrystallin-Positivität zeigte, da von den 100 α BCrystallin-positiven Muskelfasern 78 auch für p62 positiv waren (siehe Abbildung 21). Des Weiteren war p62 auf Einzelfaserebene der Marker, der in α BCrystallin-positiven Muskelfasern die höchsten Anteile an Koexpression bezüglich der anderen Färbungen zeigte. Ausgehend von α BCrystallin-positiven Einzelfasern waren bei einer Positivität in der ersten Stufe (siehe Abbildung 21) in der zweiten Stufe 69,6 % bis 94,5 % der Einzelfasern auch für p62 positiv angefärbt. Dies bestätigt erneut die Hypothese, dass nicht nur α BCrystallin sondern auch p62 im Zuge von Zellstress ein aussagekräftiger Marker sein kann. Da p62-Positivität in der Einzelfaseranalyse mit einem hohen Anteil an Koexpression anderer IBM-typischer Marker einherging, kann angenommen werden, dass bei Zellstress die Proteinakkumulation eine Schlüsselrolle spielt.

Obwohl p62 stark voneinander abweichende prozentuale Anteile in den vier IBM-Biopsien der Einzelfaseranalyse zeigte (3 % bis 21,8 % p62-positive Muskelfasern im gesamten Schnitt, siehe Abbildung 11), war der prozentuale Anteil dennoch bei allen vier Biopsien für p62-Hochregulation höher als für α BCrystallin- und 6E10-Expression. Dies kann einerseits bedeuten, dass eine gestörte Autophagie ein früherer bzw. initial stärkerer Prozess in der IBM als Zellstress und β -Amyloid-Akkumulation ist; andererseits kann es auch ein Zeichen dafür sein, dass p62 ein unspezifischerer Marker histopathologischer Prozesse bei der IBM ist.

4.1.6 COX-Defizienz, TOM20 und α BCrystallin

Von den immunhistochemischen Markern zeigten fünf einen statistisch signifikanten Zusammenhang zu α BCrystallin (p62, MHC I, TOM20, iNOS und 6E10), einzig bei COX lag keine Korrelation zu α BCrystallin in der Einzelfaseranalyse vor (siehe Tabelle 18). Bei 23 % der α BCrystallin-positiven- und 15 % der α BCrystallin-negativen Einzelfasern zeigte sich eine COX-Defizienz (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22). Es gibt somit zwar eine Tendenz, aber eine eindeutige Parallelität der beiden Marker war in der vorliegenden Arbeit nicht zu beobachten.

Bei der Auswertung des Faserdurchmessers fiel in der Einzelfaseranalyse auf, dass COX-defiziente Muskelfasern unabhängig von der α BCrystallin-Expression häufiger atroph als hypertroph waren (siehe Kapitel 3.3.3). In der Korrelationsanalyse zeigte sich für α BCrystallin-positive Einzelfasern eine statistische Signifikanz zwischen COX-Defizienz und Atrophie. Bei α BCrystallin-negativen Einzelfasern gab es eine statistische Korrelation zwischen COX-Defizienz und Hypertrophie sowie zwischen COX-Defizienz und Atrophie (siehe Tabelle 19). Bei der Fallstudie waren in den 14 ausgewerteten Muskelproben die Anteile an COX-defizienten Muskelfasern zu gering für eine vergleichende Auswertung. Des Weiteren konnte in der Einzelfaseranalyse festgestellt werden, dass bei COX-defizienten Muskelfasern der Anteil an Koexpression anderer Marker vergleichsweise geringer war als bei den anderen Färbungen (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22). Somit scheint eine COX-Defizienz in der vorliegenden Arbeit weder eindeutig mit Zellstress noch offensichtlich mit den anderen Markern einherzugehen. Dies lässt vermuten, dass eine COX-Defizienz erst spät in der Pathogenese auftritt: erst sind andere Marker im IBM-Muskelgewebe positiv; wenn aber eine COX-Defizienz vorliegt, dann sind zum größeren Anteil auch die anderen Marker vorhanden. Zudem zeigt die statistische Signifikanz zwischen COX-Defizienz, Atrophie und Hypertrophie, dass viele Muskelfasern morphologisch bereits beeinträchtigt sind, wenn eine COX-Defizienz auftritt.

Sogar TOM20 zeigte wider Erwarten keinen relevanten Zusammenhang zu COX-Defizienz: Von den 65 TOM20-positiven und α BCrystallin-positiven Einzelfasern waren nur 15 COX-defizient. Bei den 13 α BCrystallin-negativen Einzelfasern, die TOM20-positiv waren, zeigte keine ein COX-Defizit. Andersherum ist es ähnlich: von den 23 α BCrystallin-positiven Muskelfasern mit COX-Defizienz waren 15 TOM20-positiv; von den 15 α BCrystallin-negativen COX-defizienten Fasern zeigte keine eine vermehrte TOM20-Expression (siehe Kapitel 3.3.8). Auch in der Korrelationsanalyse fand sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen TOM20 und COX-Defizienz (siehe Tabelle 19). Dies ist überraschend, da sowohl COX-Defizienz als auch TOM20-Hochregulation eine mitochondriale Schädigung zeigen (Yano et al. 1997; DiMauro et al. 2012); in der vorliegenden Arbeit scheinen sie aber nur zu geringem Teil simultan in der gleichen Muskelfaser vorzukommen.

Grund dafür, dass COX-Defizienz und TOM20-Überexpression nicht simultan nachweisbar sind, könnte möglicherweise durch die jeweilige Funktion bedingt sein: Eine COX-Defizienz ist Zeichen für eine gestörte mitochondriale Proteinsynthese (DiMauro et al. 2012) und liegt bei IBM-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht vor (Oldfors et al. 1993); auch in der vorliegenden Arbeit hatten alle IBM-Patienten COX-defiziente Muskelfasern in den Biopsien.

Bezüglich TOM20 wurde in Studien *in vitro* gezeigt, dass eine Überexpression zu einem vermehrten mitochondrialen Import und einer gestörten Morphologie der Mitochondrien (Yano et al. 1997) führt. Erwähnenswert ist zudem, dass das Protein α -Synuklein an TOM20

binden und so den mitochondrialen Import von Proteinen behindern kann. Eine TOM20-Überexpression kann diesen Prozess verhindern (Devi et al. 2008) und somit einer mitochondrialen Transportstörung entgegenwirken. Da α -Synuklein-Akkumulation und eine Proteindyshomöostase miteinander einhergehen, kann angenommen werden, dass zeitgleich zu einer α -Synuklein-Akkumulation auch vermehrt p62 exprimiert ist. Dies wiederum würde erklären, warum p62-Positivität und TOM20-Überexpression simultan in der gleichen Muskelfaser vorliegen, so wie es bei einer Vielzahl der α BCrystallin-positiven Muskelfasern der Einzelanalyse der Fall war: Bei 58 der 100 α BCrystallin-positiven Muskelfasern waren sowohl TOM20 als auch p62 positiv angefärbt. Auch hierbei scheint Zellstress einen relevanten Einfluss zu haben, da nur bei sechs der 100 α BCrystallin-negativen Fasern die beiden Marker simultan exprimiert waren (siehe Kapitel 3.3.8).

Bisher gibt es keine wissenschaftliche Publikation, die das Zusammenspiel zwischen COX-I und TOM20 bzw. den Auswirkungen von jeweiliger Verringerung oder Überexpression auf den jeweils anderen Marker untersucht hat. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die mitochondrialen Prozesse, die zu TOM20-Überexpression bzw. COX-Defizienz führen, nacheinander statt simultan ablaufen. Welcher der beiden Marker dabei zuerst exprimiert wird lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht sicher ableiten; da eine COX-Defizienz aber eher später aufzutreten scheint als die anderen Marker (s. o.), kann angenommen werden, dass es im zeitlichen Ablauf erst zu einer TOM20-Überexpression und dann zu einer COX-Defizienz kommt.

Von den 100 α BCrystallin-positiven Muskelfasern waren 65 für TOM20 positiv, davon wiederum zeigte der Großteil ein TOM20-Fluoreszenzfärbesignal im ganzen Sarkoplasma mit Aussparung von Vakuolen und Einschlüssen (siehe Abbildung 18). Nur 23 der 100 Einzelfasern hatten eine COX-Defizienz. Bei den α BCrystallin-negativen Muskelfasern waren beide Marker ähnlich exprimiert, da 13 Muskelfasern positiv für TOM20 waren und 15 eine COX-Defizienz aufwiesen (siehe Abbildung 17). Somit scheint eine TOM20-Anfärbung deutlich spezifischer für Zellstress zu sein als eine COX/SDH-Färbung.

Nur drei der 100 α BCrystallin-positiven Muskelfasern waren *x-fibers* (Banwell und Engel 2000) mit normaler Morphologie. Zwei dieser drei Einzelfasern waren iNOS- und TOM20-positiv, die andere war iNOS- und TOM20-negativ. Keine dieser drei Einzelfasern hatte eine COX-Defizienz. Auch das spricht dafür, dass bei der IBM eine TOM20-Überexpression einer COX-Defizienz vorausgeht.

Um die Bedeutung von TOM20 als Marker für mitochondriale Abnormitäten bei der IBM bzw. einer besseren Aussagekraft von TOM20 gegenüber einem COX-Defizit zu prüfen, müssten weitere Versuche unternommen werden.

4.1.7 MHC I, iNOS und α BCrystallin

Ein besonders interessanter Aspekt, der sich aus den histopathologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergab, war der statistisch signifikante Zusammenhang zwischen α BCrystallin und MHC I sowohl in der Fallstudie als auch in der Einzelfaseranalyse (siehe Abbildung 5 und Tabelle 18). MHC I als Zeichen für Inflammation und α BCrystallin als Marker von Zellstress und Muskelfaserdegeneration hängen somit in den ausgewerteten Muskelproben und Biopsien signifikant miteinander zusammen. Diese Korrelation ist die Bestätigung der Hypothese, dass Entzündung, Zellstress und Myodegeneration in der Pathogenese der IBM interagieren (Schmidt 2018).

In einer Studie mit acht Myofibrilläre Myopathie(MM)- und zehn IBM-Patienten wurde anhand von Immunhistochemie das Proteasom und Immunoproteasom detaillierter untersucht (Ferrer et al. 2004). In der Studie wurde u. a. ermittelt, dass bei MM α BCrystallin am Ubiquitin-Proteasom-Weg beteiligt ist und vermutet, dass auch bei der IBM α BCrystallin in die Ubiquitin-Proteasom-Mechanismen integriert sei, die wiederum zu einer erhöhten Immunreaktivität gegenüber Immunoproteasomen führe. Es wurde sowohl bei IBM als auch bei MM festgestellt, dass es bei einem Viertel bis einem Drittel der Muskelfasern mit zugleich erhöhtem Immunoproteasom-Vorkommen und abnormalen Proteinakkumulationen auch zu einer erhöhten MHC I-Immunantwort kommt. Das simultane Auftreten von Immunoproteasom-Hochregulierung, abnormaler Proteinablagerung und verstärkter MHC I-Expression passt zu der signifikanten Korrelation von α BCrystallin und MHC I bei der Fallstudie und der Einzelfaseranalyse. Das Hitzeschockprotein wird nicht nur als Zellstress-Marker eingesetzt, sondern zeigt auch Proteinakkumulation an und ist scheinbar auch an der Funktion von Immunoproteasomen beteiligt. Die Hochregulierung von MHC I in statistisch signifikanter Korrelation zu α BCrystallin in der vorliegenden Arbeit passt somit zu den Ergebnissen der o. g. Studie, bei der die Koexistenz bei ca. 25 bis 33 % beobachtet wurde.

Es wurde gezeigt, dass durch Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen INF- γ und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Proteasomen von Immunoproteasomen ersetzt werden und die Immunoproteasomen wiederum die MHC I-Peptid-Produktion stimulieren (Groettrup et al. 2010). Die Zusammenhänge von Proteasom, Immunoproteasom und MHC I wurden bereits bei IIM gezeigt (Bhattarai et al. 2016) und können mit den hier vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden. Zu betonen ist hierbei, dass in den Biopsien der Einzelfaseranalyse beinahe alle Muskelfasern der MHC I-Färbung eine positive Fluoreszenzreaktion des Sarkolemmes zeigten. Um dennoch eine differenzierte Auswertung zu gewährleisten wurde in der vorliegenden Arbeit eine Muskelfaser als MHC I-positiv bezeichnet, wenn sie im Sarkoplasma ein positives Fluoreszenzsignal für MHC I zeigte, d. h. stark positiv für MHC I war (Brady et al. 2014). Der statistisch signifikante Zusammenhang der Einzelfaseranalyse besteht somit genau genommen zwischen α BCrystallin-positiven und stark MHC I-positiven Muskelfasern.

Wie bereits in Kapitel 1.2.11 beschrieben, führte eine Stimulation von humanen Myotuben mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und IFN- γ zu einer verstärkten α BCrystallin-Expression (Muth et al. 2009); auch TNF- α habe die gleiche Wirkung (Head et al. 1994). Es schließt sich also der Kreis der Zusammenhänge zwischen Inflammation (beispielsweise in Form von IFN- γ und MHC I), Immunoproteasom und α BCrystallin als Zellstress-Marker.

Auch zwischen iNOS und α BCrystallin bestand in der Einzelfaseranalyse ein statistisch signifikanter Zusammenhang. Von den 100 α BCrystallin-positiven Einzelfasern waren 36 iNOS-positiv; von den 100 α BCrystallin-negativen Einzelfasern zeigten nur zwei eine iNOS-Expression in der Fluoreszenzfärbung (siehe Kapitel 3.3.8). Das Vorhandensein von NO-induziertem oxidativem Stress bei der IBM ist schon lange bekannt (Yang et al. 1996). An Mikrogliazellen konnte gezeigt werden, dass eine α BCrystallin-Exposition zu vermehrter NO-Produktion und einer gesteigerten Expression der iNOS führt (Bhat und Sharma 1999). Der statistisch signifikante Zusammenhang aus der Einzelfaseranalyse bestätigt die Hypothese, dass Zellstress und oxidativer Stress miteinander einhergehen.

In der Einzelfaseranalyse von α BCrystallin-positiven Muskelfasern konnte eine iNOS-Expression prozentual am häufigsten in MHC I-positiven Fasern detektiert werden. Auch von den MHC I-positiven Muskelfasern war eine iNOS-Hochregulation die prozentual häufigste Koexpression (siehe Abbildung 21). Bei einem Viertel der 100 α BCrystallin-positiven Muskelfasern waren die Färbungen für iNOS und MHC I somit simultan positiv.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit für MHC I und iNOS jeweils einzeln sowie gemeinsam ein Zusammenhang zum Zellstress-Marker α BCrystallin hergestellt werden. Die Parallelität der drei Marker wurde auch schon für die GNE-Myopathie (Mutation im *UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine-kinase*-Gen, auch: hereditäre Einschlusskörpermyopathie 2) anhand von immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt (Fischer et al. 2013).

4.1.8 Fazit der Fallstudie und Einzelfaseranalyse

Die Zusammenschau der beschriebenen Verknüpfungen zwischen den verwendeten Markern bestärkt die Hypothese (Keller et al. 2017), dass bei der IBM eine Entzündungsreaktion abläuft (beispielsweise durch proinflammatorische Zytokine stimuliert), die zu Zellstress führen kann, der wiederum an verstärkter α BCrystallin-Expression sichtbar wird. In Folge dieser Prozesse kommt es zu fehlerhafter Proteindegradation bzw. -akkumulation. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass die Proteinakkumulation mit einer TOM20-Überexpression einhergeht, die zu mitochondrialen Abnormitäten in der betroffenen Muskelfaser und so in der Folge zu einer COX-Defizienz führt. Dies unterstützt die Hypothese, dass der Zellstress den mitochondrialen Schäden vorausgeht. Die genannten Prozesse bewirken eine Myodegeneration, die zu einer Atrophie und klinischen Schwäche der betroffenen Muskulatur führen kann.

4.2 Laser-Mikrodissektion

Mithilfe der Laser-Mikrodissektion sollten α BCrystallin-positive und α BCrystallin-negative Muskelfasern mit physiologischer und veränderter Morphologie für eine miRNA-Sequenzierung aus IBM-Biopsien ausgeschnitten werden. Trotz diverser Variationen im Versuchsablauf konnte aus den IBM-Biopsien keine RNA mit hinreichender Quantität und Qualität gewonnen werden, welche die Grenzwerte für das miRNA-Sequenzieren erreichten.

In vielen Publikationen wurde berichtet, dass die Laser-Mikrodissektion und die entsprechenden vorherigen und anschließenden Arbeitsschritte mit deutlichen Einbußen der RNA-Integrität einhergehen können und viele Optimierungen im Versuchsablauf notwendig sind (Vincent et al. 2002; Espina et al. 2006; Vanderburg und Clarke 2013).

In der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich, mittels LMD die erforderliche RNA aus α BCrystallin-positiven Zielstrukturen für ein miRNA-Sequenzieren bereitzustellen. Andere Autoren berichten beispielsweise über erfolgreiche Analysen von mtDNA-Mutationen (Cao et al. 2001), Westernblots (Salajegheh et al. 2009), Massenspektrometrie (Kley et al. 2013) oder Proteom-Analysen (Greenberg et al. 2012) mithilfe von LMD aus Skelettmuskulatur. Für eine Proteom-Analyse soll bereits eine Laser-mikrodissektierte Skelettmuskelfaser ausreichend sein (Greenberg et al. 2012).

Proteom-Untersuchungen in Kombination mit LMD wurden bereits an Biopsien von Dermatomyositis-Patienten (Salajegheh et al. 2010), Myotilinopathie-Patienten (Maerkens et al. 2016) und Einschlusskörpermyositis-Patienten durchgeführt. So konnte mithilfe von LMD das Proteom der *rinned vacuoles* im IBM-Muskelgewebe untersucht werden (Güttches et al. 2017).

Es wurden bereits erfolgreiche Analysen von RNA aus Laser-mikrodissektierten IBM-Biopsien veröffentlicht (Ivanidze et al. 2011). Hierbei wurden mithilfe von LMD CD8⁺-attackierte und nicht-CD8⁺-attackierte Muskelfasern aus IBM-Biopsien ausgeschnitten, um zu untersuchen, warum lediglich bestimmte Muskelfasern bei der IBM angegriffen werden. Hierfür wurde das Muskelgewebe mit Fluoreszenz-Kurzprotokollen für MHC I und CD8⁺ gefärbt und anschließend die Zielstrukturen ausgeschnitten. Pro Zielstruktur wurde insgesamt eine 100.000 μm^2 -große Fläche ausgeschnitten, gepoolt und die RNA mithilfe von Trizol extrahiert. Es folgte eine lineare Amplifikation und anschließend eine Mikroarray-Hybridisierung und quantitative PCR. Da in der Publikation weder die RNA-Quantität noch die RNA-Qualität genannt werden, ist ein direkter Vergleich dieser Studie mit den Versuchen der vorliegenden Arbeit nicht möglich; es scheinen aber ausreichend gute Werte für die nachfolgenden Analysen erreicht worden zu sein. Entscheidende Unterschiede zwischen den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen und des Versuchsablaufs von Ivanidze et al. 2011 sind ein deutlich kürzeres Färbeprotokoll (ca. 15 Minuten) und eine RNA-Amplifikation, welche bei der vorliegenden Arbeit aufgrund von mangelhafter RNA-Qualität nicht möglich war.

In zwei anderen Publikationen wurde die Bedeutung von B-Zellen bei inflammatorischen Myopathien, unter anderem IBM, mithilfe von LMD und *reverse transcription*(RT)-PCR untersucht (Greenberg et al. 2005; Bradshaw et al. 2007). Auch bei diesen Publikationen gibt es keine Angaben über RNA-Quantität und RNA-Qualität und es wurde ebenfalls ein sehr kurzes Fluoreszenz-Färbeprotokoll (Bradshaw et al. 2007) bzw. kurzes Färbeprotokoll mit Peroxidase und DAB (Greenberg et al. 2005) durchgeführt.

Nachfolgend werden mögliche Einflussfaktoren erläutert, die in der vorliegenden Arbeit zu einer ungenügenden RNA-Ausbeute geführt haben könnten.

4.2.1 UV-Laser als Schneidesystem

Das verwendete LMD-System von MMI schneidet das Zielgewebe mithilfe eines UV-Lasers. Der Vorteil dieses Schneidesystems ist, dass Gewebe bis zu 200 μm Schnittdicke (Espina et al. 2006) verarbeitet werden können, was in Bezug auf die IBM-Muskelbiopsien für die vorliegende Arbeit vorteilhaft war. So konnten Muskelschnitte mit 20 μm Schnittdicke verwendet werden, wobei unterschiedliche Schnittdicken keinen Effekt auf die RNA-Ausbeute hatten. Der Nachteil des UV-Schneidesystems ist, dass der UV-Laser die Zellen, die direkt unter dem Laserstrahl bzw. angrenzend liegen, schädigt. Die UV-Schädigung hat vor allem dann eine Auswirkung auf das molekulare Signal, wenn der Anteil der UV-geschädigten Zellen im mikrodisektierten Bereich über 10 % liegt (Espina et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Zielstrukturen ausgeschnitten werden, wobei diese Zielstrukturen entweder als einzelne Muskelfaser oder als Areal mit mehreren Zielstrukturen in den IBM-Biopsien vorlagen. Dies führte unweigerlich dazu, dass der Anteil der Muskelfasern, die am Rand des Schnittbereichs lagen, meistens bei über 10 % war. Es wurde zwar versucht, den Laserschnitt möglichst weit außerhalb der Muskelfasern zu lokalisieren; dies gelang allerdings häufig nicht, da keine angrenzenden nicht-Zielstruktur-Fasern mitangeschnitten werden sollten. Somit ist anzunehmen, dass es zu einer UV-Schädigung in einem Teil der ausgeschnittenen Muskelfasern kam, was wiederum negative Auswirkungen auf die RNA (Wang et al. 2010) gehabt haben könnte. Um diesen Einflussfaktor zu minimieren, könnte man ein LMD-System mit Infrarot-Laser verwenden, welches als weniger schädlich für DNA, mRNA und Proteine gilt (Bonner et al. 1997) und eine höhere RNA-Qualität verspricht (Farris et al. 2017).

4.2.2 αB Crystallin als Zielstruktur

Neben den αB Crystallin-gefärbten IBM-Biopsien wurden auch LMD-Versuche an anderen Myositis-Formen durchgeführt. Da die αB Crystallin-Färbung bei den anderen Myositiden nicht zu einem IBM-ähnlichen Färbesignal führt, wurden andere Färbungen verwendet, die wiederum bessere Ergebnisse der RNA-Mengen erzielten (siehe Kapitel 3.2.2). Dies zeigt, dass die Färbung einen ursächlichen Einfluss auf die RNA-Degradierung haben könnte.

Für die Laser-Mikrodissektion wurde α BCrystallin als Marker ausgewählt, um bei IBM-Patienten zu analysieren, ob und wie sich Zellstress auf die miRNA auswirkt. Es wird angenommen, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression von α BCrystallin, Inflammation und Myodegeneration besteht (Muth et al. 2009). Die Zielstrukturen für die Laser-Mikrodissektion stehen somit unter Zellstress und unterliegen möglicherweise bereits Degenerationsprozessen. Es kann vermutet werden, dass die α BCrystallin-positiven Zielstrukturen bereits durch die Pathogenese der IBM Einbußen in Bezug auf die RNA-Quantität haben und somit geringere RNA-Mengen enthalten als physiologische Muskelfasern. Es ist möglich, dass Muskelfasern, die unter Zellstress stehen, grundsätzlich eine erschwerte Zellpopulation für eine Laser-Mikrodissektion darstellen.

Des Weiteren wird angenommen, dass eine durchschnittliche Zelle unter optimalen Bedingungen 0,01 ng RNA pro Zelle enthält (Espina et al. 2006). Da in der vorliegenden Arbeit Skelettmuskulatur verwendet und eine Schnittdicke von 20 μ m gewählt wurde, ist anzunehmen, dass die Muskelfasern deutlich mehr RNA enthalten als der Durchschnitt. Trotzdem ist die RNA-Menge einer einzelnen Zelle bzw. Muskelfaser sehr gering, es sind daher viele Muskelfasern und optimale Versuchsbedingungen notwendig, damit überhaupt eine nennenswerte RNA-Menge im ausgeschnittenen Material enthalten ist. Es wurden Versuche mit bis zu 100 ausgeschnittenen Muskelfasern gemacht, um zu sehen, ob eine erhöhte Anzahl ausgeschnittener Zellen mit einer erhöhten RNA-Ausbeute einhergeht (siehe Tabelle 15). Das war allerdings nicht der Fall. Möglicherweise wären bessere Werte für die RNA erreichbar gewesen, wenn mehr Muskelfasern ausgeschnitten worden wären. Da allerdings Schnitte von IBM-Biopsien nur eine begrenzte Anzahl von α BCrystallin-positiven Muskelfasern enthalten, wie bereits in der Fallstudie und der Einzelfaseranalyse gezeigt, kann die Zahl der ausgeschnittenen Zielstrukturen nicht beliebig erhöht werden. Diese Limitation lässt sich beheben, indem für einen Versuch Muskelfasern aus mehreren Schnitten ausgeschnitten und zusammengeführt werden. Da die Einschlusskörpermyositis eine seltene Erkrankung ist und IBM-Biopsien rar sind, kann dieses Vorgehen nicht in großem Umfang umgesetzt werden. Im Vergleich zu anderen LMD-Versuchen, die Skelettmuskelfasern als Zielstruktur hatten (Vanderburg und Clarke 2013), war die Anzahl an möglichen Zielstrukturen ein limitierender Faktor für eine hohe RNA-Quantität.

Das Ausschneiden von α BCrystallin-positiven Muskelfasern mittels Laser-Mikrodissektion ist zeitaufwendig. Die Zielstrukturen müssen identifiziert, präzise markiert, ausgeschnitten und herausgehoben werden, wobei möglichst kein umliegendes Gewebe beschädigt werden soll und die bereits auf dem adhäsiven Cap haftenden Muskelfasern nicht verloren gehen dürfen. All dies benötigt Zeit, die wiederum zu RNA-Degradierung führen kann; es wurde gezeigt, dass bereits 30-minütige Laser-Mikrodissektion in 20 % RNA-Degradierung resultieren (Clément-Ziza et al. 2008). Um die LMD-Zeit zu verringern, wurden in der vorliegenden Arbeit somit nicht nur Einzelzellen, sondern oft auch Blöcke, in denen die Zielstruktur dominierte, ausgeschnitten. Dies führte zu einer Verkürzung der Schneidezeit, machte es

aber unvermeidlich, dass zu einem gewissen Teil auch Muskelfasern ausgeschnitten wurden, die nicht der Zielstruktur entsprachen. Das Schneiden dauerte bei der vorliegenden Arbeit in der Regel 30 bis 60 Minuten. In Publikationen, die Versuche mit Laser-Mikrodissektion und anschließender RNA-Extraktion beschreiben, wurden beispielsweise 30 bis 40 Minuten (Kinnecom und Pachter 2005; Wang et al. 2009; Farris et al. 2017), 60 bis 120 Minuten (Wang et al. 2010), aber auch bis zu drei Stunden (Buckanovich et al. 2006) als maximale Zeit für die Mikrodissektion angegeben.

Um die α BCrystallin-Expression nachzuweisen, mussten die IBM-Biopsien entsprechend gefärbt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die α BCrystallin-Färbung modifiziert und entscheidende Schritte variiert (Schnittdicke, Durchlicht/Fluoreszenz, Fixierung des Schnittes, RNA-Extraktions-Protokoll usw.). Da die Durchlicht-Färbung mit Alkalischer Phosphatase und Neufuchsin nicht so deutlich eine α BCrystallin-Positivität anfärbte und keine Verbesserung der RNA-Ausbeute zeigte (siehe Kapitel 3.2.4), wurde eine Fluoreszenzfärbung favorisiert. Auch andere Autoren berichteten von RNA-Degradation durch Durchlicht-Färbungen von Skelettmuskulatur (Stuart et al. 2016).

Die α BCrystallin-Fluoreszenzfärbung war in vielen Punkten für die RNA-Integrität nachteilig. So wird in unterschiedlichen Arbeiten berichtet, dass insbesondere wässriges Milieu, Raumtemperatur und Zeitverzögerung eine RNA-Degradation durch RNasen begünstigen (Fend et al. 1999; Kohda et al. 2000; Murakami et al. 2000; Wang et al. 2009; Cummings et al. 2011).

Wässriges Milieu: Im Fluoreszenz-Färbeprotokoll für α BCrystallin mussten die Schnitte notwendigerweise für viele Schritte im wässrigen Milieu sein. Eine Verkürzung dieser Zeiten hätte sich negativ auf das Färbeergebnis ausgewirkt, da genügend Zeit fürs Waschen, Blocken und die Inkubation gewährt sein muss.

Raumtemperatur: Wenn die Schnitte bei den Inkubationszeiten gekühlt gelagert gewesen wären, hätte dies die notwendige Inkubationszeit und somit die Zeit in wässrigem Milieu und die Gesamtdauer verlängert.

Zeitverzögerung: Die α BCrystallin-Färbung dauerte nach Modifikation über 3,5 Stunden. Kürzere Protokolle mit den gleichen Antikörper-Konzentrationen führten zu einem zu schwachen Fluoreszenz-Signal. Es wurde zudem versucht, ein ca. 22-minütiges Kurzprotokoll mit deutlich höheren Antikörper-Konzentrationen an den Schnitten durchzuführen, aber auch dabei war das Farbe-Ergebnis nicht zufriedenstellend. Andere Publikationen, die über LMD-Versuche mit anschließender RNA-Extraktion berichten, nutzen deutlich kürzere Färbeprotokolle (Fend et al. 1999; Murakami et al. 2000; Keays et al. 2005; Kinnecom und Pachter 2005; Buckanovich et al. 2006; Morrogh et al. 2007; Wang et al. 2009; Wang et al. 2010; Farris et al. 2017).

Die Parameter wässriges Milieu, Raumtemperatur und Zeitverzögerung konnten somit nicht besser optimiert werden, waren aber wahrscheinlich Faktoren, welche die RNA-Degradation

fortschreiten ließen. Alle Schritte des Färbe-Protokolls könnten noch weiter variiert werden, um möglicherweise doch eine bessere RNA-Ausbeute zu erlangen. Die Knappheit der IBM-Biopsien und das Fehlen offensichtlicher Optimierungsmöglichkeiten führten in der vorliegenden Arbeit dazu, dass weitere Versuche um das Protokoll zu modifizieren, eingestellt wurden.

4.2.3 Einflussfaktor IBM

Auch die LMD-Versuche mit nativen Schnitten führten zu einer unzureichenden RNA-Quantität (siehe Tabelle 15). Dies lässt vermuten, dass die α BCrystallin-Färbung nicht allein die Ursache für die RNA-Degradierung ist. Der Vergleich zwischen den LMD-Versuchen mit IBM-Biopsien und den LMD-Versuchen mit anderen Myositis-Formen bzw. gesundem Muskelgewebe zeigt, dass bei IBM die RNA-Integrität am Ende der Versuche besonders mangelhaft war (siehe Tabelle 15 und Tabelle 16). Hierfür gibt es neben dem Einfluss von α BCrystallin als verwendetem Marker mit der entsprechenden Färbung noch andere Erklärungsmöglichkeiten:

4.2.3.1 Pathologisches Muskelgewebe

Bei der Einschlusskörpermyositis laufen im Muskelgewebe verschiedene Prozesse der Inflammation und Degeneration parallel ab (Muth et al. 2009) und auch die Einzelfaseranalyse und die Fallstudie der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in der Pathogenese verschiedene Marker für Inflammation, Proteinakkumulation und Myodegeneration zeitgleich mit α BCrystallin exprimiert werden. Die Morphologie des Muskelgewebes ist bei IBM gestört und auch auf molekularer Ebene kann durch die genannten Prozesse die Muskelfaser so beeinträchtigt sein, dass es eventuell zu Auswirkungen auf die RNA kommen könnte.

4.2.3.2 Entnahme der Biopsien

Da die Lagerung bei Raumtemperatur und eine lange Ischämie-Dauer durch Zeitverzögerung eine RNA-Degradation begünstigen, wird empfohlen, möglichst wenig Zeit zwischen Biopsie-Entnahme und der Lagerung auf Eis bzw. dem Einfrieren vergehen zu lassen (Huang et al. 2001; Espina et al. 2006; Micke et al. 2006). Der Ablauf der Gewebe-Entnahmen konnte nicht mehr nachvollzogen werden: Es ist weder bekannt, wie sorgsam und steril die Biopsie ablief, noch, wie zeitnah eine Lagerung auf Eis bzw. das Einfrieren der Biopsien erfolgte. Somit ist für den ersten und grundlegenden Schritt im Versuchsablauf nicht bekannt, ob bereits RNA-schonende Bedingungen vorlagen. Dies könnte gewährleistet werden, indem eine prospektive Versuchsplanung stattfindet, statt wie in der vorliegenden Arbeit bereits vorhandene Biopsien zu verwenden.

4.2.3.3 Lagerung der Biopsien

Ebenso wie die Entnahme war auch nicht mehr nachvollziehbar, unter welchen Bedingungen die Biopsien bis zur Verwendung gelagert wurden.

Zwischenfälle wie beispielsweise der Ausfall eines Tiefkühlschranks oder ähnliches könnten ebenfalls Auswirkungen auf die Qualität von Gewebe bzw. die Konservierung der RNA gehabt haben. Für eine Arbeit mit LMD und anschließender RNA-Analyse wird empfohlen, eingefrorene Gewebeproben bis zu drei Monate bei -80 Grad Celsius zu lagern (Espina et al. 2006); in der vorliegenden Arbeit war es ein deutlich längerer Zeitraum, in dem die Biopsien bei -120 Grad Celsius gelagert wurden. Doch trotz dieser vorteilhaften Lagerungstemperatur ist nicht bekannt, wie konstant und störungsfrei diese Lagerung tatsächlich erfolgt ist.

Es gab durch die Laser-Mikrodissektion einige Abweichungen von der sonstigen Routine-RNA-Isolation im Versuchsablauf: Es waren sehr viele Arbeitsschritte notwendig, bis die RNA-Isolation begonnen wurde. Der Objektträger hatte eine andere Beschaffenheit und erschwerte das Kryostat-Schneiden und Färben etc., sodass es viele zusätzliche Variablen gab, welche die Güte der RNA-Ausbeute bedingten. Zudem wurde das Gewebe sehr viel umgelagert: Von der Entnahme der Biopsie bis zur RNA-Isolation musste jede Biopsie mehrmals innerhalb und zwischen Gebäuden und Einrichtungen hin- und her transportiert werden. All dies waren deutlich komplexere Bedingungen als beispielsweise bei einer Arbeit mit Zellkulturen, bei der alle Arbeitsschritte in einem Raum und an einem festgelegten Arbeitstisch ablaufen.

Mehrere Biopsien wurden bereits vor einigen Jahren entnommen und es ist nicht mehr nachvollziehbar unter welchen Bedingungen die Biopsien bis zur Verwendung für die vorliegende Arbeit gewonnen und aufbewahrt wurden. Im Vergleich zwischen den RNA-Mengen aus IBM-Biopsien und frischem Muskelgewebe war erkennbar, dass es für die RNA-Ausbeute günstiger war, wenn das Muskelgewebe wenige Tage alt war, von neuromuskulär unauffälligen Patienten stammte und große Areale statt einzelner bzw. Gruppen von Muskelfaserquerschnitten ausgeschnitten wurden (siehe Kapitel 3.2.9). Wie groß der Einfluss einzelner Parameter war, kann nicht aus den Ergebnissen abgelesen werden, da dahingehend keine systematische Untersuchung erfolgt ist. Festzustellen ist jedoch, dass die Dauer und Lagerbedingungen zwischen Biopsie-Entnahme und Laser-Mikrodissektion und die Affektion der Muskulatur im Zuge der IBM möglicherweise einen Einfluss hatten. Diese Parameter konnten aber retrospektiv nicht verändert werden.

In einem Fall wurde die α BCrystallin-Färbung statt an einer IBM-Biopsie an einer Patienten-Biopsie mit Nekrotisierender Myopathie durchgeführt. Hierbei wurden atrophe Fasern ausgeschnitten. Die RNA-Menge war in diesem Fall höher als bei den IBM-Biopsien (siehe Tabelle 15). Denkbar wäre ein Einfluss von Zellstress, für den α BCrystallin ein Marker ist: Wenn bei den IBM-Biopsien die α BCrystallin-positiven Muskelfasern ausgeschnitten wurden, dann handelte es sich hierbei um Muskelfasern, in denen Zellstress nachweisbar war. Dieser Zellstress steht mit Inflammation und Degeneration in Zusammenhang (Muth et al. 2009), was die RNA-Degradation beeinflusst und sich als niedrigere bzw. unspezifische RNA-Ausbeute gezeigt haben könnte.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hat eine histopathologische Analyse von Muskelzellstress bei der Einschlusskörpermyositis (engl. *inclusion body myositis*, IBM), der häufigsten idiopathischen inflammatorischen Myopathie des höheren Lebensalters, vorgenommen. Die Patienten entwickeln eine zunehmende Muskelatrophie mit meist asymmetrischem Verteilungsmuster und Betonung des M. quadriceps femoris und der tiefen Fingerflexoren. Durch die progressive Schwäche der Skelettmuskulatur und zusätzliche Symptome wie Dysphagie ist die Lebensqualität der Patienten erheblich eingeschränkt. Für die Diagnose wird neben der Anamnese und einer umfangreichen klinisch-neurologischen Untersuchung auch eine Muskelbiopsie benötigt. Entsprechend der histopathologischen Merkmale in IBM-Biopsien wird vermutet, dass bei der IBM ein Zusammenspiel aus Inflammation, Proteinakkumulation und Myodegeneration vorliegt, aber bisher sind die Ätiologie und Pathogenese der IBM nicht ausreichend geklärt. Da den Patienten aktuell nur individuelle Therapieversuche angeboten werden können, ist ein tieferes Verständnis der Pathomechanismen notwendig, um neue Therapiekonzepte zu entwickeln.

Es wurden drei verschiedene Methoden angewandt, um die bisher unzureichend verstandene Pathogenese der IBM zu untersuchen. Anhand von posthum entnommenen Muskelproben eines IBM-Patienten bot sich die außergewöhnliche Möglichkeit, Proben aus mehreren Muskeln zum gleichen Zeitpunkt für eine Fallstudie zur Verfügung zu haben. Da der Patient in der Neuromuskulären Spezialambulanz der Universitätsmedizin Göttingen in Behandlung war, konnten die histopathologischen Ergebnisse mit den Befunden der klinischen Untersuchung vor dem Tod verglichen werden. In der Einzelfaseranalyse wurden Biopsien von vier IBM-Patienten mit mehreren Fluoreszenz- und Durchlichtfärbungen gefärbt. Wie auch in der Fallstudie war der Fokus hierbei auf dem Zellstressmarker α BCrystallin; von besonderem Interesse war bei der Einzelfaseranalyse außerdem TOM20 (*translocase of the outer membrane 20*) als – bei IBM innovativem – Marker für mitochondriale Transportstörungen und Abnormalitäten. In der Einzelfaseranalyse wurde geprüft, welche der histopathologischen Marker simultan in der gleichen Muskelfaser exprimiert waren. So konnten Färbemuster und Koexpressionen detektiert und analysiert werden. Als dritte Methode wurde versucht, mithilfe von Laser-Mikrodissektion (LMD) einzelne α BCrystallin-positive und -negative Fasern aus IBM-Biopsien auszuschneiden, um die miRNA zu untersuchen.

In Zusammenschau der Befunde der Neuromuskulären Spezialambulanz und der histopathologischen Merkmale der posthum entnommenen Muskelproben konnte bei der Fallstudie festgestellt werden, dass eine Atrophie auf mikroskopischer Ebene mit einer abnehmenden Muskelkraft einherging. Zudem konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen α BCrystallin und MHC I (*major histocompatibility complex* der Klasse I) festgestellt werden. Bei der Einzelfaseranalyse konnten Färbemuster, die Morphologie und der Faserdurchmesser ausgehend von α BCrystallin-positiven und -negativen Muskelfasern miteinander verglichen

werden. Die Auswertung der simultanen Expression der Marker zeigte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen α BCrystallin und jeweils den Markern TOM20, MHC I, p62, iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) und 6E10. Die RNA-Extraktion aus α BCrystallin-positiven Muskelfasern von IBM-Patienten mittels LMD für eine miRNA-Analyse war nicht erfolgreich, obwohl der Versuchsablauf vielfach variiert wurde. Aufgrund der vielen Einflussfaktoren konnte trotz mehrfacher Variationen und Modifikationen kein erfolgsversprechender Versuchsablauf gefunden werden.

Die Ergebnisse der Fallstudie und Einzelfaseranalyse bestätigen die Vermutung, dass bei der IBM ein Zusammenspiel aus Inflammation, Zellstress, Proteindyshomöostase und Myodegeneration vorliegt. Für die zeitlichen Abläufe dieser Mechanismen lässt sich mithilfe der Einzelfaseranalyse eine Hypothese aufstellen: Bei der IBM kommt es zu einer Inflammation im Muskel, die zu Zellstress führt; dies kann durch den Marker α BCrystallin histopathologisch nachgewiesen werden. Der Zellstress wiederum geht mit einer gestörten Autophagie einher, die zu der IBM-typischen Proteinakkumulation führt. Um einer mitochondrialen Transportstörung entgegenzuwirken, wird TOM20 überexprimiert, woraus allerdings eine gestörte Morphologie der Mitochondrien und später eine Cytochrom-c-Oxidase-Defizienz resultiert. Die Muskelfasern degenerieren zunehmend, sodass es zu einer makroskopischen Atrophie und klinischen Muskelschwäche der IBM-Patienten kommt. Eben diese Myodegeneration erschwerte die LMD maßgeblich. In den α BCrystallin-positiven Muskelfasern, aus denen die miRNA analysiert werden sollte, laufen Prozesse ab, die sowohl die Morphologie als auch die RNA-Integrität beeinträchtigen. Die LMD zur Gewinnung der miRNA erforderte einen komplexen Versuchsablauf mit vielen Schritten und Einflussfaktoren, begonnen bei der Biopsieentnahme vor vielen Jahren über das Schneiden mittels UV-Laser bis hin zur RNA-Isolation. Es kann angenommen werden, dass die UV-Laser-Mikrodissektion zur miRNA-Analyse von α BCrystallin-positiven Muskelfasern keine geeignete Methode ist, um epigenetische Fragestellungen bezüglich Zellstress bei der Einschlusskörpermyositis zu beantworten.

6 Literaturverzeichnis

- Aiken CT, Kaake RM, Wang X, Huang L (2011): Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Mol Cell Proteomics* 10, R110.006924
- Alexanderson H (2016): Physical exercise as a treatment for adult and juvenile myositis. *J Intern Med* 280, 75–96
- Arahata K, Engel AG (1986): Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. III: Immunoelectron microscopy aspects of cell-mediated muscle fiber injury. *Ann Neurol* 19, 112–125
- Arnardottir S, Borg K, Ansved T (2004): Sporadic inclusion body myositis: morphology, regeneration, and cytoskeletal structure of muscle fibres. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 917–920
- Askanas V, Engel WK (2003): Proposed pathogenetic cascade of inclusion-body myositis: importance of amyloid-beta, misfolded proteins, predisposing genes, and aging. *Curr Opin Rheumatol* 15, 737–744
- Askanas V, Engel WK (2006): Inclusion-body myositis: a myodegenerative conformational disorder associated with A β , protein misfolding, and proteasome inhibition. *Neurology* 66, S39-48
- Askanas V, Engel WK, Alvarez RB (1992): Light and electron microscopic localization of beta-amyloid protein in muscle biopsies of patients with inclusion-body myositis. *Am J Pathol* 141, 31–36
- Askanas V, Engel WK, Alvarez RB, McFerrin J, Broccolini A (2000): Novel immunolocalization of alpha-synuclein in human muscle of inclusion-body myositis, regenerating and necrotic muscle fibers, and at neuromuscular junctions. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 592–598
- Askanas V, Engel WK, Nogalska A (2009): Inclusion body myositis: a degenerative muscle disease associated with intra-muscle fiber multi-protein aggregates, proteasome inhibition, endoplasmic reticulum stress and decreased lysosomal degradation. *Brain Pathol* 19, 493–506
- Askanas V, Engel WK, Nogalska A (2015): Sporadic inclusion-body myositis: A degenerative muscle disease associated with aging, impaired muscle protein homeostasis and abnormal mitophagy. *Biochim Biophys Acta* 1852, 633–643
- Babu JR, Geetha T, Wooten MW (2005): Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *J Neurochem* 94, 192–203
- Badrising UA, Maat-Schieman M, van Duinen SG, Breedveld F, van Doorn P, van Engelen B, van den Hoogen F, Hoogendijk J, Höweler C, de Jager A, et al. (2000): Epidemiology of inclusion body myositis in the Netherlands: a nationwide study. *Neurology* 55, 1385–1387
- Banwell BL, Engel AG (2000): AlphaB-crystallin immunolocalization yields new insights into inclusion body myositis. *Neurology* 54, 1033–1041
- Baron P, Galimberti D, Meda L, Prat E, Scarpini E, Conti G, Moggio M, Prella A, Scarlato G (2000): Synergistic effect of beta-amyloid protein and interferon gamma on nitric oxide production by C2C12 muscle cells. *Brain* 123, 374–379
- Benskey MJ, Perez RG, Manfredsson FP (2016): The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function - Implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* 137, 331–359

- Benveniste O, Guiguet M, Freebody J, Dubourg O, Squier W, Maisonobe T, Stojkovic T, Leite MI, Allenbach Y, Herson S, et al. (2011): Long-term observational study of sporadic inclusion body myositis. *Brain* 134, 3176–3184
- Berlit P (Hrsg.): *Klinische Neurologie*. 3. Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2012
- Bhat NR, Sharma KK (1999): Microglial activation by the small heat shock protein, alpha-crystallin. *Neuroreport* 10, 2869-2873
- Bhattarai S, Ghannam K, Krause S, Benveniste O, Marg A, de Bruin G, Xin BT, Overkleeft HS, Spuler S, Stenzel W, Feist E (2016): The immunoproteasomes are key to regulate myokines and MHC class I expression in idiopathic inflammatory myopathies. *J Autoimmun* 75, 118–129
- Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, Pohida T, Chuaqui R, Goldstein S, Liotta LA (1997): Laser Capture Microdissection: Molecular Analysis of Tissue. *Science* 278, 1481–1483
- Bradshaw EM, Orihuela A, McArdel SL, Salajegheh M, Amato AA, Hafler DA, Greenberg SA, O'Connor KC (2007): A local antigen-driven humoral response is present in the inflammatory myopathies. *J Immunol* 178, 547-556
- Brady S, Squier W, Hilton-Jones D (2013): Clinical assessment determines the diagnosis of inclusion body myositis independently of pathological features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84, 1240–1246
- Brady S, Squier W, Sewry C, Hanna M, Hilton-Jones D, Holton JL (2014): A retrospective cohort study identifying the principal pathological features useful in the diagnosis of inclusion body myositis. *BMJ Open* 4, e004552
- Brooke MH, Engel WK (1969): The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 1. Adult male and female. *Neurology* 19, 221–233
- Buchman S, Bandyopadhyay S, Baccon J, Wicklund M (2016): A surprising case of inclusion body myositis with positive endomysial C5b-9 staining. *Muscle Nerve* 53, 991–992
- Buckanovich RJ, Sasaroli D, O'Brien-Jenkins A, Botbyl J, Conejo-Garcia JR, Benencia F, Liotta LA, Gimotty PA, Coukos G (2006): Use of immuno-LCM to identify the in situ expression profile of cellular constituents of the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 5, 635–642
- Cao Z, Wanagat J, McKiernan SH, Aiken JM (2001): Mitochondrial DNA deletion mutations are concomitant with ragged red regions of individual, aged muscle fibers: analysis by laser-capture microdissection. *Nucleic Acids Res* 29, 4502–4508
- Carstens PO, Schmidt J (2014): Diagnosis, pathogenesis and treatment of myositis: recent advances. *Clin Exp Immunol* 175, 349–358
- Chahin N, Engel AG (2008): Correlation of muscle biopsy, clinical course, and outcome in PM and sporadic IBM. *Neurology* 70, 418–424
- Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, Xu HE (2017): Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin* 38, 1205–1235
- Cherin P, Pelletier S, Teixeira A, Laforet P, Simon A, Herson S, Eymard B (2002): Intravenous immunoglobulin for dysphagia of inclusion body myositis. *Neurology* 58, 326

- Chis R, Sharma P, Bousette N, Miyake T, Wilson A, Backx PH, Gramolini AO (2012): α -Crystallin B prevents apoptosis after H₂O₂ exposure in mouse neonatal cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303, H967-978
- Chou SM (1967): Myxovirus-like structures in a case of human chronic polymyositis. *Science* 158, 1453–1455
- Clément-Ziza M, Munnich A, Lyonnet S, Jaubert F, Besmond C (2008): Stabilization of RNA during laser capture microdissection by performing experiments under argon atmosphere or using ethanol as a solvent in staining solutions. *RNA* 14, 2698–2704
- Compston A (2010): Aids to the Investigation of Peripheral Nerve Injuries. Medical Research Council: Nerve Injuries Research Committee. His Majesty's Stationery Office: 1942; pp. 48 (iii) and 74 figures and 7 diagrams; with Aids to the Examination of the Peripheral Nervous System. By Michael O'Brien for the Guarantors of Brain. Saunders Elsevier: 2010; pp. [8] 64 and 94 Figures. *Brain* 133, 2838-2844
- Cox D, Ecroyd H (2017): The small heat shock proteins α B-crystallin (HSPB5) and Hsp27 (HSPB1) inhibit the intracellular aggregation of α -synuclein. *Cell Stress Chaperones* 22, 589–600
- Cox FM, Verschuuren JJ, Verbist BM, Niks EH, Wintzen AR, Badrising UA (2009): Detecting dysphagia in inclusion body myositis. *J Neurol* 256, 2009–2013
- Cox FM, Titulaer MJ, Sont JK, Wintzen AR, Verschuuren JJGM, Badrising UA (2011a): A 12-year follow-up in sporadic inclusion body myositis: an end stage with major disabilities. *Brain* 134, 3167–3175
- Cox FM, Reijnierse M, van Rijswijk CSP, Wintzen AR, Verschuuren JJ, Badrising UA (2011b): Magnetic resonance imaging of skeletal muscles in sporadic inclusion body myositis. *Rheumatology (Oxford)* 50, 1153–1161
- Cummings M, McGinley CV, Wilkinson N, Field SL, Duffy SR, Orsi NM (2011): A robust RNA integrity-preserving staining protocol for laser capture microdissection of endometrial cancer tissue. *Anal Biochem* 416, 123–125
- Dalakas MC (2006): Inflammatory, immune, and viral aspects of inclusion-body myositis. *Neurology* 66, S33-38
- de Camargo LV, de Carvalho MS, Shinjo SK, de Oliveira ASB, Zanoteli E (2018): Clinical, Histological, and Immunohistochemical Findings in Inclusion Body Myositis. *Biomed Res Int* 2018, 5069042
- Decarlo K, Emley A, Dadzie OE, Mahalingam M (2011): Laser capture microdissection: methods and applications. *Methods Mol Biol* 755, 1–15
- Deenen JCW, van Doorn PA, Faber CG, van der Kooij AJ, Kuks JBM, Notermans NC, Visser LH, Horlings CGC, Verschuuren JJGM, Verbeek ALM, van Engelen BGM (2016): The epidemiology of neuromuscular disorders: Age at onset and gender in the Netherlands. *Neuromuscul Disord* 26, 447–452
- DeMuro C, Lewis S, Lowes L, Alfano L, Tseng B, Gnanasakthy A (2016): Development of the sporadic inclusion body myositis physical functioning assessment. *Muscle Nerve* 54, 653–657

- Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK (2008): Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* 283, 9089–9100
- Dillmann WH (1999): Heat shock proteins and protection against ischemic injury. *Infect Dis Obstet Gynecol* 7, 55–57
- Dimachkie MM, Barohn RJ (2013): Inclusion body myositis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13, 321
- Dimachkie MM, Barohn RJ (2014): Inclusion Body Myositis. *Neurol Clin* 32, 629–646
- DiMauro S, Tanji K, Schon EA (2012): The many clinical faces of cytochrome c oxidase deficiency. *Adv Exp Med Biol* 748, 341–357
- Dubourg O, Wanschitz J, Maisonobe T, Béhin A, Allenbach Y, Herson S, Benveniste O (2011): Diagnostic value of markers of muscle degeneration in sporadic inclusion body myositis. *Acta Myol* 30, 103–108
- Dubowitz V, Sewry CA, Oldfors A: *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. 3. Auflage; Saunders, Oxford 2006
- Eliyahu E, Pnueli L, Melamed D, Scherrer T, Gerber AP, Pines O, Rapaport D, Arava Y (2010): Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-dependent manner. *Mol Cell Biol* 30, 284–294
- Engel WK, Askanas V (2006): Inclusion-body myositis: clinical, diagnostic, and pathologic aspects. *Neurology* 66, S20-29
- Espina V, Wulfkühle JD, Calvert VS, VanMeter A, Zhou W, Coukos G, Geho DH, Petricoin EF, Liotta LA (2006): Laser-capture microdissection. *Nat Protoc* 1, 586–603
- Farris S, Wang Y, Ward JM, Dudek SM (2017): Optimized Method for Robust Transcriptome Profiling of Minute Tissues Using Laser Capture Microdissection and Low-Input RNA-Seq. *Front Mol Neurosci* 10, 185
- Fend F, Raffeld M (2000): Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol* 53, 666–672
- Fend F, Emmert-Buck MR, Chuaqui R, Cole K, Lee J, Liotta LA, Raffeld M (1999): Immuno-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis. *Am J Pathol* 154, 61–66
- Ferrer I, Martín B, Castaño JG, Lucas JJ, Moreno D, Olivé M (2004): Proteasomal expression, induction of immunoproteasome subunits, and local MHC class I presentation in myofibrillar myopathy and inclusion body myositis. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 484–498
- Fischer C, Kleinschnitz K, Wrede A, Muth I, Kruse N, Nishino I, Schmidt J (2013): Cell stress molecules in the skeletal muscle of GNE myopathy. *BMC Neurol* 13, 24
- Fitzner M, Schmidt J (2016): Entzündliche Muskelerkrankungen: Aktueller Stand zur Diagnostik und Therapie der Myositis. *Aktuel Rheumatol* 41, 232–242
- FratTA P, Engel WK, Van Leeuwen FW, Hol EM, Vattermi G, Askanas V (2004): Mutant ubiquitin UBB+1 is accumulated in sporadic inclusion-body myositis muscle fibers. *Neurology* 63, 1114–1117

- Fratta P, Engel WK, McFerrin J, Davies KJA, Lin SW, Askanas V (2005): Proteasome inhibition and aggresome formation in sporadic inclusion-body myositis and in amyloid-beta precursor protein-overexpressing cultured human muscle fibers. *Am J Pathol* 167, 517–526
- Garrido-Gil P, Fernandez-Rodríguez P, Rodríguez-Pallares J, Labandeira-Garcia JL (2017): Laser capture microdissection protocol for gene expression analysis in the brain. *Histochem Cell Biol* 148, 299–311
- Gibson C, Johnson NE, Eastwood E, Heatwole C (2016): Inclusion Body Myositis: What Most Impacts Patients' Lives. *J Clin Neuromuscul Dis* 18, 67–71
- Glenner GG, Wong CW (1984): Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885–890
- Greenberg SA, Bradshaw EM, Pinkus JL, Pinkus GS, Burleson T, Due B, Bregoli L, O'Connor KC, Amato AA (2005): Plasma cells in muscle in inclusion body myositis and polymyositis. *Neurology* 65, 1782-1787
- Greenberg SA, Salajegheh M, Judge DP, Feldman MW, Kuncel RW, Waldon Z, Steen H, Wagner KR (2012): Etiology of limb girdle muscular dystrophy 1D/1E determined by laser capture microdissection proteomics. *Ann Neurol* 71, 141–145
- Griggs RC, Askanas V, DiMauro S, Engel A, Karpati G, Mendell JR, Rowland LP (1995): Inclusion body myositis and myopathies. *Ann Neurol* 38, 705–713
- Groettrup M, Kirk CJ, Basler M (2010): Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol* 10, 73–78
- Guimaraes JB, Zanoteli E, Link TM, de Camargo LV, Facchetti L, Nardo L, Fernandes A da RC (2017): Sporadic Inclusion Body Myositis: MRI Findings and Correlation With Clinical and Functional Parameters. *AJR Am J Roentgenol* 209, 1340–1347
- Güttsches AK, Brady S, Krause K, Maerkens A, Uszkoreit J, Eisenacher M, Schreiner A, Galozzi S, Mertens-Rill J, Tegenthoff M, et al. (2017): Proteomics of rimmed vacuoles define new risk allele in inclusion body myositis. *Ann Neurol* 81, 227–239
- Harkness TA, Nargang FE, van der Klei I, Neupert W, Lill R (1994): A crucial role of the mitochondrial protein import receptor MOM19 for the biogenesis of mitochondria. *J Cell Biol* 124, 637–648
- Head MW, Corbin E, Goldman JE (1994): Coordinate and independent regulation of alpha B-crystallin and hsp27 expression in response to physiological stress. *J Cell Physiol* 159, 41–50
- Hilton-Jones D, Brady S (2016): Diagnostic criteria for inclusion body myositis. *J Intern Med* 280, 52–62
- Hiniker A, Daniels BH, Lee HS, Margeta M (2013): Comparative utility of LC3, p62 and TDP-43 immunohistochemistry in differentiation of inclusion body myositis from polymyositis and related inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol Commun* 1, 29
- Huang J, Qi R, Quackenbush J, Dauway E, Lazaridis E, Yeatman T (2001): Effects of ischemia on gene expression. *J Surg Res* 92, 222–227

- Ishii T, Yanagawa T, Kawane T, Yuki K, Seita J, Yoshida H, Bannai S (1996): Murine peritoneal macrophages induce a novel 60-kDa protein with structural similarity to a tyrosine kinase p56lck-associated protein in response to oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* **226**, 456–460
- Ivanidze J, Hoffmann R, Lochmüller H, Engel AG, Hohlfeld R, Dornmair K (2011): Inclusion body myositis: laser microdissection reveals differential up-regulation of IFN- γ signaling cascade in attacked versus nonattacked myofibers. *Am J Pathol* **179**, 1347-1359
- Jackson CE, Barohn RJ, Gronseth G, Pandya S, Herbelin L, Muscle Study Group (2008): Inclusion body myositis functional rating scale: a reliable and valid measure of disease severity. *Muscle Nerve* **37**, 473–476
- Karpati G, Pouliot Y, Carpenter S (1988): Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. *Ann Neurol* **23**, 64–72
- Keays KM, Owens GP, Ritchie AM, Gilden DH, Burgoon MP (2005): Laser capture microdissection and single-cell RT-PCR without RNA purification. *J Immunol Methods* **302**, 90–98
- Keller CW, Schmidt J, Lünemann JD (2017): Immune and myodegenerative pathomechanisms in inclusion body myositis. *Ann Clin Transl Neurol* **4**, 422–445
- Kinnecom K, Pachter JS (2005): Selective capture of endothelial and perivascular cells from brain microvessels using laser capture microdissection. *Brain Res Brain Res Protoc* **16**, 1–9
- Kissel JT, Mendell JR, Rammohan KW (1986): Microvascular deposition of complement membrane attack complex in dermatomyositis. *N Engl J Med* **314**, 329–334
- Klemenz R, Fröhli E, Steiger RH, Schäfer R, Aoyama A (1991): Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3652–3656
- Kley RA, Maerkens A, Leber Y, Theis V, Schreiner A, van der Ven PFM, Uszkoreit J, Stephan C, Eulitz S, Euler N, et al. (2013): A combined laser microdissection and mass spectrometry approach reveals new disease relevant proteins accumulating in aggregates of filaminopathy patients. *Mol Cell Proteomics* **12**, 215-227
- Kohda Y, Murakami H, Moe OW, Star RA (2000): Analysis of segmental renal gene expression by laser capture microdissection. *Kidney Int* **57**, 321–331
- Kuusisto E, Suuronen T, Salminen A (2001): Ubiquitin-binding protein p62 expression is induced during apoptosis and proteasomal inhibition in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 223–228
- Lang-Rollin I, Rideout H, Stefanis L (2003): Ubiquitinated inclusions and neuronal cell death. *Histol Histopathol* **18**, 509–517
- Lindersson E, Beedholm R, Højrup P, Moos T, Gai W, Hendil KB, Jensen PH (2004): Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J Biol Chem* **279**, 12924–12934
- Lindgren U, Roos S, Hedberg Oldfors C, Moslemi AR, Lindberg C, Oldfors A (2015): Mitochondrial pathology in inclusion body myositis. *Neuromuscul Disord NMD* **25**, 281–288
- Lloyd TE, Mammen AL, Amato AA, Weiss MD, Needham M, Greenberg SA (2014): Evaluation and construction of diagnostic criteria for inclusion body myositis. *Neurology* **83**, 426–433

- Lünemann JD, Schmidt J, Schmid D, Barthel K, Wrede A, Dalakas MC, Münz C (2007): Beta-amyloid is a substrate of autophagy in sporadic inclusion body myositis. *Ann Neurol* 61, 476–483
- Malik A, Hayat G, Kalia JS, Guzman MA (2016): Idiopathic Inflammatory Myopathies: Clinical Approach and Management. *Front Neurol* 7, 64
- Maerkens A, Olivé M, Schreiner A, Feldkirchner S, Schessl J, Uszkoreit J, Barkovits K, Güttches AK, Theis V, Eisenacher M, et al. (2016): New insights into the protein aggregation pathology in myotilinopathy by combined proteomic and immunolocalization analyses. *Acta Neuropathol Commun* 4, 8
- Micke P, Ohshima M, Tahmasebpoor S, Ren ZP, Ostman A, Pontén F, Botling J (2006): Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Lab Invest* 86, 202–211
- MMI Molecular Machines & Industries (2015): Single Cell Solutions <https://www.molecular-machines.com/wp-content/uploads/MMI-Single-Cell-Solutions.pdf>; abgerufen am 14.06.2020
- Model K, Prinz T, Ruiz T, Radermacher M, Krimmer T, Kühlbrandt W, Pfanner N, Meisinger C (2002): Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J Mol Biol* 316, 657–666
- Molberg Ø, Dobloug C (2016): Epidemiology of sporadic inclusion body myositis. *Curr Opin Rheumatol* 28, 657–660
- Morrogh M, Olvera N, Bogomolny F, Borgen PI, King TA (2007): Tissue preparation for laser capture microdissection and RNA extraction from fresh frozen breast tissue. *Biotechniques* 43, 41–42, 44, 46 passim
- Müller-Höcker J (1990): Cytochrome c oxidase deficient fibres in the limb muscle and diaphragm of man without muscular disease: an age-related alteration. *J Neurol Sci* 100, 14–21
- Murakami H, Liotta L, Star RA (2000): IF-LCM: laser capture microdissection of immunofluorescently defined cells for mRNA analysis rapid communication. *Kidney Int* 58, 1346–1353
- Muth IE, Barthel K, Bähr M, Dalakas MC, Schmidt J (2009): Proinflammatory cell stress in sporadic inclusion body myositis muscle: overexpression of alphaB-crystallin is associated with amyloid precursor protein and accumulation of beta-amyloid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80, 1344–1349
- Needham M, Corbett A, Day T, Christiansen F, Fabian V, Mastaglia FL (2008a): Prevalence of sporadic inclusion body myositis and factors contributing to delayed diagnosis. *J Clin Neurosci* 15, 1350–1353
- Needham M, James I, Corbett A, Day T, Christiansen F, Phillips B, Mastaglia FL (2008b): Sporadic inclusion body myositis: phenotypic variability and influence of HLA-DR3 in a cohort of 57 Australian cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79, 1056–1060
- Nogalska A, Terracciano C, D’Agostino C, King Engel W, Askanas V (2009): p62/SQSTM1 is overexpressed and prominently accumulated in inclusions of sporadic inclusion-body myositis muscle fibers, and can help differentiating it from polymyositis and dermatomyositis. *Acta Neuropathol* 118, 407–413
- Nogalska A, D’Agostino C, Engel WK, Klein WL, Askanas V (2010): Novel demonstration of amyloid- β oligomers in sporadic inclusion-body myositis muscle fibers. *Acta Neuropathol* 120, 661–666

- Oldfors A, Larsson NG, Lindberg C, Holme E (1993): Mitochondrial DNA deletions in inclusion body myositis. *Brain* 116, 325–336
- Oldroyd A, Lilleker J, Chinoy H (2017): Idiopathic inflammatory myopathies - a guide to subtypes, diagnostic approach and treatment. *Clin Med (Lond)* 17, 322–328
- Olthoff A, Carstens PO, Zhang S, von Fintel E, Friede T, Lotz J, Frahm J, Schmidt J (2016): Evaluation of dysphagia by novel real-time MRI. *Neurology* 87, 2132–2138
- Panigrahi R, Kubiszewski-Jakubiak S, Whelan J, Vrielink A (2015): The Design and Structure of Outer Membrane Receptors from Peroxisomes, Mitochondria, and Chloroplasts. *Structure* 23, 1783–1800
- Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P (2008): Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* 65, 1272–1284
- Price MA, Barghout V, Benveniste O, Christopher-Stine L, Corbett A, de Visser M, Hilton-Jones D, Kissel JT, Lloyd TE, Lundberg IE, et al. (2016): Mortality and Causes of Death in Patients with Sporadic Inclusion Body Myositis: Survey Study Based on the Clinical Experience of Specialists in Australia, Europe and the USA. *J Neuromuscul Dis* 3, 67–75
- Rak M, Bénit P, Chrétien D, Bouchereau J, Schiff M, El-Khoury R, Tzagoloff A, Rustin P (2016): Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. *Clin Sci (Lond)* 130, 393–407
- Rider LG, Werth VP, Huber AM, Alexanderson H, Rao AP, Ruperto N, Herbelin L, Barohn R, Isenberg D, Miller FW (2011): Measures of adult and juvenile dermatomyositis, polymyositis, and inclusion body myositis: Physician and Patient/Parent Global Activity, Manual Muscle Testing (MMT), Health Assessment Questionnaire (HAQ)/Childhood Health Assessment Questionnaire (C-HAQ), Childhood Myositis Assessment Scale (CMAS), Myositis Disease Activity Assessment Tool (MDAAT), Disease Activity Score (DAS), Short Form 36 (SF-36), Child Health Questionnaire (CHQ), physician global damage, Myositis Damage Index (MDI), Quantitative Muscle Testing (QMT), Myositis Functional Index-2 (FI-2), Myositis Activities Profile (MAP), Inclusion Body Myositis Functional Rating Scale (IBMFRS), Cutaneous Dermatomyositis Disease Area and Severity Index (CDASI), Cutaneous Assessment Tool (CAT), Dermatomyositis Skin Severity Index (DSSI), Skindex, and Dermatology Life Quality Index (DLQI). *Arthritis Care Res (Hoboken)* 63 Suppl 11, S118-157
- Rifai Z, Welle S, Kamp C, Thornton CA (1995): Ragged red fibers in normal aging and inflammatory myopathy. *Ann Neurol* 37, 24–29
- Rose MR, ENMC IBM Working Group (2013): 188th ENMC International Workshop: Inclusion Body Myositis, 2-4 December 2011, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 23, 1044–1055
- Rose MR, Jones K, Leong K, Walter MC, Miller J, Dalakas MC, Brassington R, Griggs R (2015): Treatment for inclusion body myositis. *Cochrane Database Syst Rev*
- Salajegheh M, Pinkus JL, Nazareno R, Amato AA, Parker KC, Greenberg SA (2009): Nature of „Tau“ immunoreactivity in normal myonuclei and inclusion body myositis. *Muscle Nerve* 40, 520–528
- Salajegheh M, Kong SW, Pinkus JL, Walsh RJ, Liao A, Nazareno R, Amato AA, Krastins B, Morehouse C, Higgs BW, et al. (2010): Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) conjugates proteins in dermatomyositis muscle with perifascicular atrophy. *Ann Neurol* 67, 53–63

- Schmidt J (2018): Current Classification and Management of Inflammatory Myopathies. *J Neuromuscul Dis* 5, 109–129
- Schmidt J, Dalakas MC (2010): Pathomechanisms of inflammatory myopathies: recent advances and implications for diagnosis and therapies. *Expert Opin Med Diagn* 4, 241–250
- Schmidt J, Rakocevic G, Raju R, Dalakas MC (2004): Upregulated inducible co-stimulator (ICOS) and ICOS-ligand in inclusion body myositis muscle: significance for CD8+ T cell cytotoxicity. *Brain* 127, 1182–1190
- Schmidt J, Barthel K, Wrede A, Salajegheh M, 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, 1228–1240
- Schmidt J, Barthel K, Zschüntzsch J, Muth IE, Swindle EJ, Hombach A, Sehmisch S, Wrede A, Lühder F, Gold R, Dalakas MC (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, 1102–1114
- Schmidt K, Schmidt J (2017): Inclusion body myositis: advancements in diagnosis, pathomechanisms, and treatment. *Curr Opin Rheumatol* 29, 632–638
- Stuart CA, Stone WL, Howell MEA, Brannon MF, Hall HK, Gibson AL, Stone MH (2016): Myosin content of individual human muscle fibers isolated by laser capture microdissection. *Am J Physiol Cell Physiol* 310, C381–C389
- van der Pas J, Hengstman GJD, ter Laak HJ, Borm GF, van Engelen BGM (2004): Diagnostic value of MHC class I staining in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 136–139
- Vanderburg CR, Clarke MSF (2013): Laser capture microdissection of metachromatically stained skeletal muscle allows quantification of fiber type specific gene expression. *Mol Cell Biochem* 375, 159–170
- Villanova M, Kawai M, Lübke U, Oh SJ, Perry G, Six J, Ceuterick C, Martin JJ, Cras P (1993): Rimmed vacuoles of inclusion body myositis and oculopharyngeal muscular dystrophy contain amyloid precursor protein and lysosomal markers. *Brain Res* 603, 343–347
- Vincent VAM, DeVoss JJ, Ryan HS, Murphy GM (2002): Analysis of neuronal gene expression with laser capture microdissection. *J Neurosci Res* 69, 578–586
- Walter MC, Lochmüller H, Toepfer M, Schlotter B, Reilich P, Schröder M, Müller-Felber W, Pongratz D (2000): High-dose immunoglobulin therapy in sporadic inclusion body myositis: a double-blind, placebo-controlled study. *J Neurol* 247, 22–28
- Wang JP, Chi RF, Wang K, Ma T, Guo XF, Zhang XL, Li B, Qin FZ, Han XB, Fan BA (2018): Oxidative stress impairs myocyte autophagy, resulting in myocyte hypertrophy. *Exp Physiol* 103, 461–472
- Wang S, Wang L, Zhu T, Gao X, Li J, Wu Y, Zhu H (2010): Improvement of tissue preparation for laser capture microdissection: application for cell type-specific miRNA expression profiling in colorectal tumors. *BMC Genomics* 11, 163

- Wang T, Luo S, Qin H, Xia Y (2018): Hsp90 inhibition renders iNOS aggregation and the clearance of iNOS aggregates by proteasomes requires SPSB2. *Free Radic Biol Med* 117, 90–98
- Wang WZ, Oeschger FM, Lee S, Molnár Z (2009): High quality RNA from multiple brain regions simultaneously acquired by laser capture microdissection. *BMC Mol Biol* 10, 69
- Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H (2018): Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. *Int J Mol Sci* 19, 3805
- Yang CC, Alvarez RB, Engel WK, Askanas V (1996): Increase of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in inclusion-body myositis. *Neuroreport* 8, 153–158
- Yano M, Kanazawa M, Terada K, Namchai C, Yamaizumi M, Hanson B, Hoogenraad N, Mori M (1997): Visualization of mitochondrial protein import in cultured mammalian cells with green fluorescent protein and effects of overexpression of the human import receptor Tom20. *J Biol Chem* 272, 8459–8465
- Yunis EJ, Samaha FJ (1971): Inclusion body myositis. *Lab Invest* 25, 240–248

Danksagung

Mein größter Dank geht an Prof. Dr. med. Jens Schmidt, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Obwohl die Methode der LMD mich vor viele Hürden stellte und das Ziel manchmal sehr fern schien, hat er mich stets ermutigt und unterstützt, sodass letztendlich eine umfangreiche Arbeit entstanden ist. Ich danke Prof. Dr. med. Schmidt für sein Engagement, seine Sorgfalt und seinen wissenschaftlichen Enthusiasmus.

Ich danke Prof. Dr. med. Philipp Ströbel für die Ko-Betreuung dieser Arbeit.

Dr. med. Karsten Kummer danke ich für seine Unterstützung und die Hilfe bei kleinen und großen Fragen; ganz gleich ob es um Färbungen, Statistik oder die Verschriftlichung der Arbeit ging. Insbesondere danken möchte ich für die mehrmalige Durchsicht dieses Manuskripts.

Ein herzlicher Dank geht an das Team der Neuropathologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main für die Gewebeaufbereitung und Färbung der Muskelproben der Fallstudie. Zudem möchte ich mich bei dem Patienten dafür bedanken, dass er zustimmte seinen Körper nach dem Tod für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung zu stellen. Die Vielzahl der posthum entnommenen Muskelproben bietet eine außergewöhnliche Möglichkeit, die Histopathologie der Einschlusskörpermyositis besser zu verstehen.

Ich danke Dr. med. Sabrina Zechel, die mir viele neue Ideen gegeben hat und für alle Fragen im Bereich der Neuropathologie zur Verfügung stand. Ihre Expertise und Erfahrung waren bei der Etablierung und Anfertigung der Fluoreszenz-Doppelfärbungen für die Einzelfaseranalyse eine wesentliche Unterstützung und sie stand mir mit Rat und Tat zur Seite.

Weiterhin danke ich Dr. med. Hanibal Bohnenberger für die Einführung am LMD-Gerät.

Ich danke Iris Iben, der guten Seele des Labors für ihre Geduld, fürs Mitdenken und gemeinsame Ausprobieren und für den täglichen Einsatz für die ganze AG Schmidt. Ich danke Dr. rer. nat. Matthias Schmidt für die Hinweise und Anregungen zum Thema Statistik und allen anderen Mitgliedern der AG Schmidt für die gegenseitige Hilfsbereitschaft.

Ich danke Anna Katharina Franziska Beatrice Götttsche für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor. Auch wenn sich die Themen unserer Doktorarbeiten voneinander entfernt haben, so war sie die ganze Zeit meine erste Ansprechpartnerin in allen Fragen rund ums Labor und die Doktorarbeit. Danke für die Geduld und das gemeinsame Meistern von Höhen und Tiefen.