

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Antikörperspezifische Unterschiede und die zentrale Rolle
langlebiger Plasmazellen beim Antisyndrom

Antibody-specific differences and the key role of long-lived
plasma cells in antisynthetase syndrome

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Barbara Paesler

aus München

Datum der Promotion: 18.12.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Darstellungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VIII
Abstract	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Klassifikation der Myositiden	1
1.1.1 Historische Entstehung der Klassifikation	3
1.1.2 Aktuelle Klassifikation und Autoantikörper	4
1.2 Das Antisynthetase Syndrom (ASyS)	6
1.2.1 Epidemiologie	9
1.2.2 Klinische Manifestation	9
1.2.3 ASyS ein Überlappungssyndrom	11
1.2.4 Therapie.....	12
1.2.5 Histologie	13
1.2.6 Pathophysiologie.....	19
1.3 Ziel des Forschungsprojekts.....	28
2 MATERIAL	30
2.1 Allgemeine Chemikalien	30
2.2 Reagenzien für die Histologie.....	30
2.3 Antikörper	30
2.4 PCR-Sonden	31
2.5 Kommerzielle Kits und Enzyme	32
2.6 Laborausüstung und Hilfsmittel	32
3 METHODEN	33
3.1 Patientendaten	33
3.1.1 Angaben zum Patientenkollektiv	33
3.1.2 Auswertung der Patientendaten.....	33
3.2 Histologie.....	34
3.2.1 Anfertigung von Gefrierschnitten.....	34
3.2.2 Immunhistochemische Färbungen	35
3.2.3 Immunfluoreszenzfärbungen.....	36
3.2.4 Histologische Auswertung.....	37
3.2.5 Elektronenmikroskopie.....	39
3.3 Analyse der Genexpression.....	39
3.3.1 RNA-Isolierung.....	39

3.3.2	RNA-Isolierung der nukleären und zytoplasmatischen Fraktion.....	40
3.3.3	cDNA Synthese.....	41
3.3.4	Quantitative Real Time Polymerase Ketten Reaktion (qPCR)	42
3.3.5	Analyse und Auswertung	42
3.4	Statistische Auswertung	43
4	ERGEBNISSE	44
4.1	Zusammenfassung der klinischen Daten im Vergleich	44
4.2	Histologische Charakteristik der Autoantikörpergruppen.....	46
4.2.1	Grundsätzliche Myopathologie bei ASyS	46
4.2.2	Autoantikörperspezifische Besonderheiten.....	50
4.3	Immunzellinfiltrate und Skelettmuskelinflammation	53
4.3.1	Panleukozytäre Infiltrate.....	53
4.3.2	Makrophageninvasion und veränderte Th2-Aktivierung.....	55
4.3.3	T-Zellen und veränderte Th1-Aktivierung.....	57
4.4	Die Schlüsselrolle der B- und Plasmazellen	58
4.4.1	Infiltrate von CD20 ⁺ -Zellen.....	59
4.4.2	Plasmazellinfiltrate und „homing“	61
4.4.3	Chemotaxis in entzündete Skelettmuskulatur	63
4.5	Aktinaggregation und -shuttling	66
4.6	Abschließender Überblick der Ergebnisse.....	69
5	DISKUSSION	70
5.1	Autoantikörper und klinischer Phänotyp	73
5.2	Autoantikörperspezifische Immunaktivierung	76
5.3	Die Rolle langlebiger Plasmazellen	79
5.4	Autoantikörperspezifische Unterschiede myonukleärer Aktinaggregation ...	84
5.5	Fazit und Ausblick	85
6	Literaturverzeichnis	90
	Eidesstattliche Versicherung	XII
	Lebenslauf	XIII
	Danksagung	XIV
	Bescheinigung Statistik Fehler! Textmarke nicht definiert.	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Zeitstrahl zur Entstehung der aktuellen Myositisklassifikation	4
Abbildung 2 Überblick bedeutender Autoantikörper bei den IIMs	5
Abbildung 3: Funktion der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (AaRS)	8
Abbildung 4: Aufbau der Skelettmuskulatur	13
Abbildung 5: Aktinstoffwechsel	18
Abbildung 6: Scores und histologische Merkmale	37
Abbildung 7: Histologische Färbungen des Muskelgewebes bei ASyS	48
Abbildung 8: Immunhistochemisch gefärbtes Muskelgewebe	49
Abbildung 9: Bewertung der Myopathie bei ASyS über den „Overall Severity Score“	50
Abbildung 10: Ausprägung von Atrophie, Nekrose und Regeneration der Muskelzellen bei ASyS	51
Abbildung 11: Gefäß- und Bindegewebeptnologie bei ASyS	52
Abbildung 12: MHC-I-, MHC-II-Expression und Komplementaktivierung bei ASyS ..	53
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung von Leukozyteninfiltraten bei ASyS	54
Abbildung 14: Quantitative PCR-Analyse von Genen der Th2-Zell- und Makrophagenregulation.....	56
Abbildung 15: Quantitative PCR-Analyse von Genen der Th1- und Th17- Zelleregulation	58
Abbildung 16: Quantitative PCR von Genen der P- und B-Zellregulierung bei ASyS	60
Abbildung 17: Plasmazell- und B-Zellinfiltration im Muskelgewebe bei ASyS	62
Abbildung 18 Färbungen von Chemokinliganden und -rezeptoren im Muskelgewebe bei ASyS.....	64
Abbildung 19: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von CXCL12 kombiniert mit CD4, CD20 & CD68.....	65
Abbildung 20: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von CXCL13 kombiniert mit CD20, CD8 & CD68.....	65
Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Charakteristika bei ASyS.....	66
Abbildung 22: Quantitative PCR-Analyse der Gene für Aktinpolymerisation und – „shuttling“ bei ASyS	68

Darstellungsverzeichnis

Tabelle 1: Klinischer Phänotyp und Autoantikörper bei IIM	2
Tabelle 2: Allgemeine Chemikalien	30
Tabelle 3: Reagenzien für die Immunhistologie.....	30
Tabelle 4: Primäre Antikörper.....	30
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper	31
Tabelle 6: TaqMan-Sonden von Life Technologies, Deutschland.....	31
Tabelle 7: Kommerzielle Kits und Enzyme	32
Tabelle 8: Laborausrüstung und Hilfsmittel	32
Tabelle 9: Kurzinterpretation der Färbungen	35
Tabelle 10: Scores und Punktwerte der histologischen Merkmale	37
Tabelle 11: Reaktionsbedingungen der qPCR	42
Tabelle 12: Klinische Daten.....	46
Tabelle 13: Chemokine und Zellen die sie exprimieren	63
Tabelle 14 : Die Ergebnisse im Überblick.....	69

Abkürzungsverzeichnis

AaRS	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
ACTA1	α -skeletal-actin
ACTB	beta-Aktin
AF	Alexa Fluor
AK	Antikörper
ANA	Antinukleärer Antikörper
anti-CCP-Antikörper	Antikörper gegen citrullinierte Proteine
anti-EJ-Antikörper	Antikörper gegen die Glycyl-t-RNA-Synthetase
anti-Jo1-Autantikörper	Antikörper gegen die Histidyl-t-RNA-Synthetase
anti-KS-Antikörper	Antikörper gegen die Asparaginyt-t-RNA-Synthetase
anti-Ku-Antikörper	Antikörper gegen p70/p80-Proteine
anti-MDA5-Antikörper	Antikörper gegen das melanoma-differentiation-5-Gen
anti-Mi2-Antikörper	Antikörper gegen die nukleäre Helikase
anti-NXP2-Antikörper	Antikörper gegen nukleäre Transkriptionsfaktoren
anti-OJ-Antikörper	Antikörper gegen die Isoleucyl-t-RNA-Synthetase
anti-PL-12-Antikörper	Antikörper gegen die Alanyl-t-RNA-Synthetase
anti-PL-7-Antikörper	Antikörper gegen die Threonyl-t-RNA-Synthetase
anti-PM-Scl	Antikörper gegen nukleoläre Multiproteinkomplexe
anti-Ro52/60-Antikörper	Antikörper gegen 52 oder 60kD Ribonukleoproteine
anti-SAE-Antikörper	Antikörper gegen das SUMO activating enzyme
anti-SRP-Antikörper	Antikörper gegen Signal recognition Particle
anti-TIF1g-Antikörper	Antikörper gegen tripartite motife Proteine
anti-Tyr-Antikörper	Antikörper gegen die Tyrosil-t-RNA-Synthetase
anti-ZO-Antikörper	Antikörper gegen die Phelylalanin-t-RNA-Synthetase
APRIL	A Proliferation Inducing Ligand
APZ	Professionelle antigenpräsentierende Zellen
Arp2/3	Aktin-like Peptide-2/3
ARS	anti-Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Antikörper
ASyS	Antisynthetase Syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	B cell activating factor
BAX	Bcl-2-associated Protein X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCR	B-Zellrezeptor
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Cesium
C5b-9	Terminal Complement Complex
Caspase	Cysteinyt-Aspartate-specific Protease
CCL	Chemokinligand
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Clusters of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CFL2	Cofilin-2
CK	Creatin-Kinase
CK-Wert	Creatin-Kinase-Wert
CLL	Chemokinligand
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CRP	C-reaktives Protein
CT-Wert	cycle threshold

CXCL	Chemokinligand
CXCR	Chemokinrezeptor
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidinphenylindol
DC	Dendritische Zellen
dsDNS	Doppelstrag- Desoxyribonukleinsäure
dl	Deziliter
DLCO	Diffusing capacity of the lung for carbon monoxide
DM	Dermatomyositis
DMARDs	Disease-modifying anti-rheumatic drug
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMCV	Encephalomyokarditisvirus
ENMC	European Neuromuscular Centres
<i>et al.</i>	et alii
EVG	Elastika-van-Gieson
FAS	Todesrezeptor Fas (APO-1, CD 95)
FCS	Grams Kristallviolett, Fertiglösung
FOXP	Forkhead box proteins
FVC	Forcierte Vitalkapazität
g	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
G	Gauge
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HL	Human leukemia
HLA	Humane Leukozyten Antigene
HMGCR	-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HRS	Histidyl-tRNA-Synthetase
HRCT	High-resolution computed tomography
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IIM	Idiopathische inflammatorische Myopathie
IL	Interleukin
ILD	interstitial lung disease
IL-R	Interleukinrezeptor
IMNM	Immune-mediated necrotising myopathy
IMPP	Immune myopathies with perimysial pathology
IPO9	Importin-9
LPS	Lipopolysaccharid
MAA	Myositis assoziierte Autoantikörper
MAC	Membrane Attac Complex
MCTD	Mixed Connective Tissue Diseases
MDAAT	Myositis Disease Activity Assessment Tool
µg	Mikrogramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
mRNA	Messenger-RNA
MSA	Myositis spezifische Autoantikörper

MUM 1	Multiple Myeloma Oncogene 1
n.	Anzahl der Teilnehmer
NC	Normalkontrollen
NCK	Cytoplasmic protein
NDC	non disease control
NK	Natürliche Killerzellen, Natürliche Killerzellen
NKT	Natürliche Killer-T-Zellen
NLS	nuclear localization signal
N-WASP	Protein aus der Wiskott-Aldrich-Syndrome-Familie
OM	Overlap Myositiden
OSS	Overall Severity Score
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFN2	Profilin-2
PGK	Phosphoglyceratkinase
PM	Polymyositis
POD	Meerrettichperoxidase
PZ	Plasmazellen
qPCR	quantitative Real-Time (Echtzeit-) PCR
RA	Rheumatoiden Arthritis
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RQ	relative quantity (relative Quantität)
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SEM	standard error of the mean
sIBM	sporadic inclusion body myositis
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SSc	Systemische Sklerose
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Taq	Thermophilus aquaticus
TCR	T-cell-receptor
TGF	Transforming Growth Factor
Th1	T1-Helferzelle
Th17	T17-Helferzelle
Th2	T2-Helferzelle
TLC	Totale Lungenkapazität
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
tRNA	Transfer-RNA
U/I	Enzymeinheit pro Liter
U1-RNP	Antikörper gegen das U1 Ribonukleoprotein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XPO6	Exportin-6
YRS	Tyrosyl-tRNA Synthetase
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Zusammenfassung

Die Antisynthetase Syndrom-assoziierte (ASyS) Myositis zählt zu den idiopathisch inflammatorischen Myopathien, genauer zur Subgruppe der Myositiden. Klinisch ist es charakterisiert durch Myositis, interstitielle Lungenerkrankung, Raynaud Syndrom, Fieber und seronegative Arthritis. Laborchemisch wird bei den meisten Patienten einer, von bisher acht beschriebenen ASyS-spezifischen Autoantikörpern gefunden. Es wurde gezeigt, dass sich Patienten mit ASyS sowohl klinisch, histologisch, als auch auf molekularer Ebene unterscheiden, jedoch standen detaillierte Untersuchungen bislang aus. Hier schließt die aktuelle Arbeit an und beleuchtet funktionelle autoantikörper-spezifische Unterschiede der drei häufigsten Subgruppen (anti-PL-7, -PL-12, & -Jo1⁺ Patienten).

Die Auswertung der klinischen Daten bestätigt die aktuelle Studienlage: Jo1⁺ Patienten zeigen vermehrt Muskelsymptome, Arthralgien und Hautbeteiligung, während die PL-7⁺ und PL-12⁺ Patienten klinisch sehr ähnlich sind, wobei Fieber und interstitielle Lungenerkrankung die prominentesten Symptome waren. Histologisch konnten als typische Charakteristika perifaszikuläre Muskelfasernekrosen, -atrophie, -regeneration, sarkolemmale MHC-I- und MHC-II-Expression, sowie peri- und endomysiale Fibrose und Fragmentierung visualisiert werden. Diese Merkmale traten bei Jo1⁺ Biopsaten grundsätzlich stärker ausgeprägt auf.

Weiterhin wurden infiltrierende Immunzellen charakterisiert. In allen Gruppen waren Makrophagen, Leukozyten, Plasmazellen sowie T- und B-Zellen zu finden. Die Genexpression typischer proinflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ , TNF α verglichen mit Kontrollen war signifikant hochreguliert. Außerdem war die Genexpression antiinflammatorischer Zytokine (Bsp. TGF β , IL-4R) in den PL-12/PL-7 Kohorten gesteigert, was für einen abweichenden Pathomechanismus zwischen den Subgruppen, im Sinne einer alternativen Immunregulierung, spricht.

Zudem fanden sich B- und Plasmazellaktivatoren wie APRIL und BAFF, was eine Schlüsselrolle der Zellen in der Krankheitsentstehung vermuten lässt. Doppelfärbungen von Makrophagen, B-, sowie T-Zellen und Plasmazellen mit verschiedenen Chemokinen (CXCR4, CXCL12, CXCL13) zeigten eine Koexpression von CXCL12 und CXCL13 mit Makrophagen und B-Zellen, was eine durch Makrophagen stimulierte Migration von B-Zellen in den entzündeten Muskel nahelegt. Plasmazellen, ebenso wie die verstärkte Expression spezifischer Chemokine, konnten außerdem in der Umgebung infiltrierender Immunzellen gezeigt werden.

Basierend auf vorangehenden Ergebnissen wurde zudem der Aspekt der Aktinaggregatbildung untersucht. Auch hier unterschieden sich PL-7⁺ und PL-12⁺ Patienten von Jo1⁺ Patienten. Während in den ersten Gruppen vermehrt undulierende Tubuli in Gefäßendothelien detektierbar waren, zeigten letztere häufiger intranukleäre Aktineinschlüsse in Myonuklei. Die Genexpression war bei allen Gruppen verglichen mit Kontrollen verändert, was auf eine pathologische Regulation des intrazellulären Aktinstoffwechsels hinweist.

Abstract

Antisynthetase syndrome-associated (ASyS) myositis is part of the idiopathic inflammatory myopathies, more precisely classified among the “overlap myositis” group. It is clinically characterized by myositis, interstitial lung disease, fever and seronegative arthritis. Most of the patients are seropositive for one out of the eight myositis-specific antibodies the so-called anti-ARS autoantibodies.

It was shown that patients can be distinguished based on clinical, histopathological and molecular features, but more explicit investigations are missing so far. The current study addressed the question of antibody-specific functional differences and similarities among the three most frequent subgroups (anti-PL-7, -PL-12, & -Jo1⁺ patients).

Our interpretation of clinical data confirmed latest study results: anti-Jo1⁺ patients are presenting more severe muscle symptoms, arthralgia and skin involvement, while anti-PL-7/-PL-12⁺ patients appeared phenotypically similar and showed predominantly fever and interstitial lung disease. Histological characteristics were: perifascicular myofiber necrosis and -atrophy as well as regenerating fibers and areas of MHC-I- and MHC-II-expression plus peri- and endomysial fibrosis and fragmentation. All features appeared more severe in anti-Jo1 muscle samples.

Furthermore, a characterization of immune cell infiltration showed macrophages, leukocytes such as T and B-cells, as well as plasmacells in all subgroups. Gene expression of typical proinflammatory cytokines like IFN- γ , TNF α was upregulated compared to controls. The anti-PL-7/-PL-12 patients' biopsies also showed upregulated antiinflammatory cytokines like TGF β and IL-4R. This provides evidence for an alternative immune mechanism among those subgroups.

B-cells and plasmacells showed upregulated APRIL and BAFF, which makes it likely that these cells play a key role in the pathogenesis of the disease. Double stains of macrophages, B-, T cells and plasmacells with various chemokines (CXCR4, CXCL12, CXCL13) highlighted co-expression of CXCL12 and CXCL13 with macrophages and B-cells. This points to a macrophage-induced migration of B cells towards muscle inflammation. Finally, plasmacells and upregulation of all chemokines could also be shown in the vicinity of immune cell infiltration.

Based on earlier results, actin aggregation in antisynthetase syndrome-associated myositis was investigated. Anti-PL-7/-PL-12⁺ patients showed undulating tubules in endothelial cells more frequently, while anti-Jo1⁺ patients presented actin aggregates

in myonuclei. Alteration of gene expression regulating actin shuttling and -metabolism, compared to controls was seen in all groups indicating their aberrant regulation.

1 EINLEITUNG

1.1 Klassifikation der Myositiden

Myositiden stellen eine heterogene Gruppe erworbener inflammatorischer Skelettmuskelerkrankungen dar, die neben einer progredienten Bewegungseinschränkung mit einer erhöhten Morbidität durch den möglichen zusätzlichen Befall extramuskulärer Organe wie der Lunge oder dem Herzen, sowie einer fakultativen Disposition gegenüber malignen Erkrankungen (bei einigen Entitäten im Erwachsenenalter) einhergeht.^{1,2}

Die Klassifikation der idiopathisch inflammatorischen Myopathien (IIM) gelingt nach klinischen, histologischen und immunpathologischen Gesichtspunkten. Dabei wird aktuell in fünf Hauptgruppen unterteilt: (1) Dermatomyositis (DM), (2) Polymyositis (PM), (3) Immunvermittelte nekrotisierende Myositis (IMNM), (4) Sporadische Einschlusskörpermyositis (sIBM) und (5) Overlap Myositis.^{3,4,5}

Die Inzidenz beträgt etwa 10/100.000 (siehe Epidemiologie). Während bei der DM eine juvenile und adulte Form beschrieben ist, treten die anderen Erkrankungen vorwiegend im Alter >18 Jahren auf, wobei sich die sIBM meist erst im Alter >50 Jahren ausbildet.¹

Klinisch manifestieren sich die fünf Subtypen zum Teil sehr unterschiedlich (siehe **Tabelle 1**). So geht die DM oft mit typischen Hauteffloreszenzen, einer charakteristischen Lungenbeteiligung und seltener auch Herzbeteiligung, sowie im Erwachsenenalter mit einem erhöhten Malignomrisiko einher.² Eine proximal betonte Muskelschwäche wird meistens beklagt, muss aber nicht immer vorhanden sein. Die sIBM zeichnet sich durch einen therapierefraktären, langsam progredienten Verlauf mit Schluckbeschwerden und asymmetrisch beginnender Muskelschwäche die langen Fingerbeuger- und Quadricepsmuskeln betreffend aus, die meist mit der fünften Lebensdekade beginnt und nach ca. 10 Jahren das Gehen bis zur Rollstuhlpflicht einschränken kann.

Bei der IMNM steht die Myopathie selbst ganz im Vordergrund. Außerdem sollten andere Krankheitsursachen ausgeschlossen werden, so z.B. toxische oder virale exogene Einflüsse, oder einige der Muskeldystrophien (Gliedergürteldystrophien) des Erwachsenenalters (z.B. Dysferlinopathien, Anoctaminopathien). Man geht heute davon aus, dass in der Vergangenheit aus Mangel an histologischen und immunologischen Untersuchungsmethoden die relativ unscharfe Diagnose PM zu häufig gestellt wurde, heute kann man jedoch basierend auf homogenen klinischen

Verläufen, Autoantikörperprofilen und genauen histologischen Methoden spezifischere Diagnosen stellen und Subentitäten präziser definieren.^{4,5}

Tabelle 1: Klinischer Phänotyp und Autoantikörper bei IIM

	Auto- antikörper	Symptome	
		muskulär	extramuskulär
Dermatomyositis			
Subgruppen: Adulte, juvenile, myopathische Form	Mi-2 MDA5 SAE NXP2 TIF-1 γ 50% Sero ⁻	Proximal betonte Muskelschwäche, Dysphagie	ILD, Arthritis, Malignome (v.a. NXP2 ⁺ , TIF-1 γ ⁺), Gottron´s Papeln, livides Erythem, Ödeme der Lider, V-sign, shawl-sign
Immunvermittelte nekrotisierende Myositis			
Subgruppen: keine	SRP HMGR 20% Sero ⁻	Myopathie/Schwäche der Gliedmaßen steht im Vordergrund: untere > obere Extremität, z.T. bulbär, Kardiomyopathie sehr selten	Malignome (Risiko bei HMGR ⁺ und sero ⁻ Patienten leicht erhöht) Pulmonale Symptome selten
Sporadische Einschlusskörpermyositis			
Subgruppen: keine	cN1A 66% Sero ⁻	asymmetrisch beginnende Muskelschwäche der Quadricepsmuskeln und langen Fingerbeuger Verlauf langsam progredient meist therapierefraktär Dysphagie,	keine
Overlap Myositis			
Subgruppen: u.a. Sjögren Syndrom, Sklerodermie, Rheumatoide Arthritis ASyS	RNP PmScL Ku Ro52 Jo1 PL-7 PL-12 OJ EJ KS Zo YRS	Muskelschmerz, Muskelschwäche, Dysphagie	Arthralgie/Arthritis ILD, Herzbeteiligung, Raynaud-Syndrom, Sicca-Syndrom Mechanikerhände und -füße, untypische Hautveränderungen möglicherweise Malignome

Die Pathogenese der einzelnen Erkrankungen ist nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich ist jedoch eine autoimmune Genese bei dem ASyS, der IMNM und der DM. Bei der sIBM spielen neben zellulären Immunmechanismen, überwiegend die T-Zell-Funktion betreffend, auch degenerative und mitochondriale Mechanismen eine Rolle. Die sIBM lässt sich, neben den typischen entzündlichen Infiltraten,

histopathologisch durch geränderte Vakuolen, Proteinaggregatbildung und mitochondriale Anomalien diagnostizieren. Eine Komplementaktivierung mit arbiträr verteilten Muskelfasernekrosen zeichnet die IMNM aus. Die DM ist durch eine perimysial akzentuierte Entzündung mit Makrophagen, sowie B- und T-Zelleninfiltraten, Muskelfaseratrophien in perifaszikulärer Lage und eine spezifische Vaskulopathie gekennzeichnet.⁶ Zudem scheint zumindest bei der IMNM, DM und sIBM die Disposition durch bestimmte Haplotypen humaner Leukozyten Antigene (HLA) pathogenetisch eine Rolle zu spielen.^{7,8,9}

Durch den Einsatz neuer biochemischer Methoden, z.B. der Immunpräzipitation, wurde mit den Subtypen der IIM das Auftreten verschiedener Myositis-assoziiierter Autoantikörper (MAA) und Myositis-spezifischer Autoantikörper (MSA) in Verbindung gebracht. Die regelmäßige Bestimmung dieser Autoantikörper ergänzt heute die klinische und histologische Klassifizierung der IIMs (siehe Abschnitt 1.1.2).⁴

1.1.1 Historische Entstehung der Klassifikation

Erstmals wurde die Dermatomyositis in den späten 1860er Jahren von Ernst Leberecht Wagner (12. März 1829 – 10. Februar 1888) und Heinrich Unverricht (18. September 1853 – 22. April 1912) neben der schon bekannten „reinen“ Muskelentzündung, bezeichnet als PM, als eine weitere Myositisform, die mit typischen Hauterscheinungen zusätzlich zur Myopathie einhergehe, beschrieben.^{10,11} 1975 wurde erstmals von Bohan und Peter eine Klassifikation, die sich an klinisch morphologischen Gesichtspunkten orientierte, für die PM und DM entworfen.¹² 1995 wurde die sIBM in den Kriterien miteingefasst,¹³ wenngleich sie bereits in den 60-er Jahren als eigene Entität beschrieben wurde. Weitere 9 Jahre später folgte 2004 die Erweiterung der Klassifikation durch die IMNM, obschon auch hier erwähnt sei, dass nekrotisierende Myopathien bereits viel früher beschrieben wurden.¹⁴ Die Einteilung wurde in den Folgejahren Thema diverser Forschungsprojekte, immer mit dem Fokus, die immunologischen Pathomechanismen der Myositis weiter aufzudecken.⁵

Durch Love *et al.*¹⁵ wurde die Existenz von Autoantikörpern erstmals 1991 zu einem weiteren Bestandteil für Klassifikation, Pathogenese und Diagnostik der IIM. Dies wurde 2004 in einer neuen Klassifikation von Troyanov *et al.*¹⁶ gefestigt. Hier wird der Fokus vor allem auf die Tatsache gelegt, dass es überlappende Syndrome rheumatologischer Erkrankungen mit Myositiden gibt, und von der Subgruppe der „Overlap Myositiden“ (OM) (siehe 1.2.3) gesprochen.

Durch die Verbindung neuester Diagnostikmethoden, der großen Anzahl bereits im Zusammenhang mit der IIM gefundener Autoantikörper, sowie der Neubewertung histo-morphologischer Unterscheidungsmerkmale z.B. durch Pestronk¹⁷ 2011 entstand die aktuelle Klassifikation, die 2014 im 205th international ENMC Workshop „Pathology diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies“ in Naarden, Niederlande mit interdisziplinärem und internationalem Konsensus erarbeitet wurde (siehe **Abbildung 2**).^{5,3}

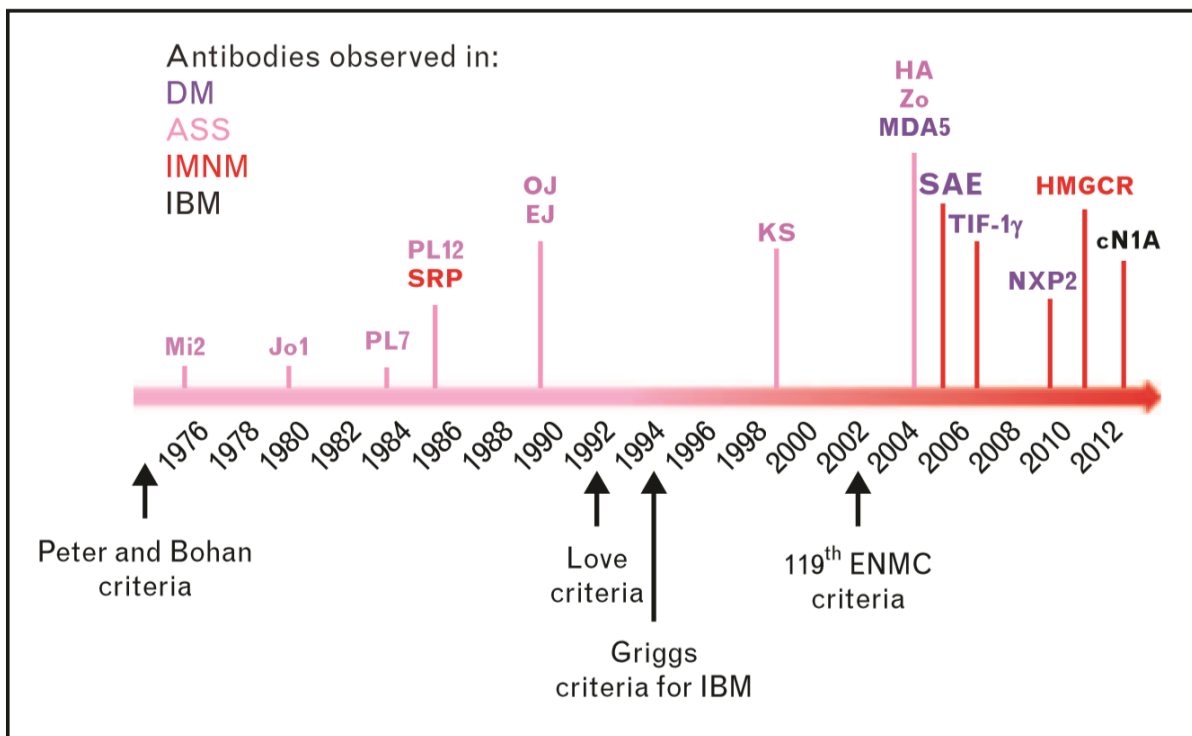


Abbildung 1: Zeitstrahl zur Entstehung der aktuellen Myositisklassifikation

Dargestellt sind einschlägige Jahreszahlen, der Entstehung der IIM Klassifikation, sowie der Entdeckung neuer Myositis-spezifischer Autoantikörper (MSA) und Myositis-assoziiierter Autoantikörper (MAA). Graphik entnommen aus Benveniste et al. 2016.⁴

1.1.2 Aktuelle Klassifikation und Autoantikörper

In den letzten Jahrzehnten wurde, wie oben erwähnt, durch verschiedene Autoren und Forschungsgruppen die Präzision der Klassifikationen der IIMs und ihre klinische Nutzbarkeit angezweifelt.

Die Möglichkeit zur Unterteilung in weitere Subgruppen bzw. neue Krankheitsentitäten wurde dabei nicht zuletzt durch die Erkenntnis über das Auftreten Myositis-spezifischer Autoantikörper (MSA) und Myositis-assoziiierter Autoantikörper (MAA) geprägt.

Als Myositis-spezifisch werden die Antikörper bezeichnet, weil sie zum einen fast ausschließlich bei den Myositiden zu finden sind, zum anderen spricht für die Spezifität

der MSA der Nachweis jeweils nur eines Myositis-spezifischen Antikörpertyps bei einem definierten Patienten (sollten zwei auto-AK positiv getestet werden, ist meist einer falsch positiv).

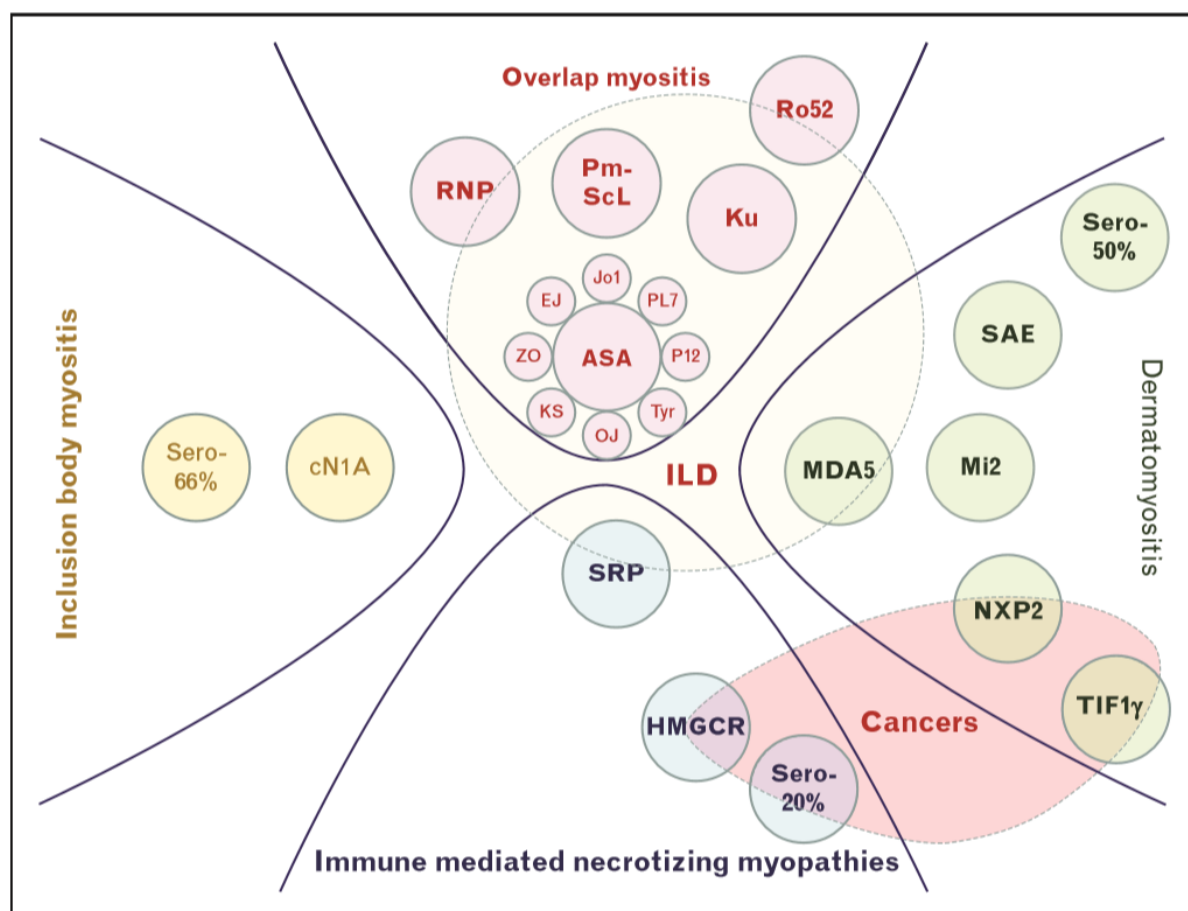


Abbildung 2 Überblick bedeutender Autoantikörper bei den IIMs

Eine Übersichtsdarstellung des Vorhandenseins von Krebs und IDL, sowie Myositis-spezifischen, oder Myositis-assoziierten Antikörpern, bei vier Subgruppen der IIMs. Graphik entnommen aus Benveniste et al. 2016.⁴

Acht der für die Myositis spezifischen Antikörper treten hauptsächlich im Zusammenhang mit dem Antisynthetase-Syndrom (anti-Jo1, -PL-7, -PL-12, -EJ, -OJ, -KS, -Tyr und -ZO, siehe 1.2) fünf mit der DM (anti-Mi2, -SAE, -NXP2, -TIF-1 γ und -MDA5), zwei im Zusammenhang mit der IMNM (anti-SRP und -HMGCR) und einer mit der sIBM (anti-cN1A) assoziiert auf (**Abbildung 2**).^{4,15} Es wurde in verschiedenen Studien belegt, dass mit Präsenz dieser Autoantikörper im Serum der betroffenen Patienten klinisch z.B. ein erhöhtes Krebsrisiko, das Manifestationsalter der Erkrankung, die Schwere der Myositis und andere prognostisch relevante Charakteristika signifikant einhergehen und diese auch mit bestimmten histologischen Merkmalen korrelieren.^{4,5,18,19,20}

Bei den MAA handelt es sich um eine Gruppe von Autoantikörpern, die hauptsächlich gegen nukleäre und nukleoläre Antigene verschiedener Zellen gerichtet und neben den Myopathien auch bei anderen Erkrankungen wie dem Systemischen Lupus Erythematoses (SLE), der systemischen Sklerose (SSc) oder dem Sjögren-Syndrom zu finden sind (z.B. Anti-PM-Scl, -Ku, -U1-RNP, -Ro52/SSA, und -La/SSB).^{21,22} Dabei ist es möglich, dass ein Patient für mehrere dieser Antikörper und begleitend dazu für einen (einzelnen) MSA positiv getestet wird.^{4,5,18} Dieser Umstand führte zu der Annahme, dass sich die Pathogenese einiger Myositiden womöglich nicht ausschließlich im Muskelgewebe sondern vielmehr im Muskel- und Bindegewebe und auch anderen Geweben/Organen des ganzen Körpers mit spezifischer Verteilung abspielt, wodurch der heterogen verwandte Begriff „Overlap Myositis“ weiter untermauert wurde (siehe 1.2.3).^{4,5,16,20}

Da die Pathophysiologie der IIMs jedoch noch weitgehend ungeklärt ist und auch nur bei ca. der Hälfte bis 2/3 der Myositispatienten die oben genannten Autoantikörper gefunden werden können, ist mit der Diagnostik der Antikörper allein eine aktuelle Klassifikation aber nach wie vor nicht möglich. Daher behalten die histologische und klinische Beurteilung bei der Unterteilung/Einteilung der Patienten eine sehr wichtige Rolle und auch in Zukunft wird immer eine kombinierte klinische, histologische und Autoantikörper-basierte Diagnostik nötig sein, um eine präzise Diagnosefindung zu ermöglichen.^{4,5}

1.2 Das Antisynthetase Syndrom (ASyS)

Das Antisynthetase-Syndrom, Kernthema meiner Arbeit, ist definiert durch die klinische Kombination aus Myositis, interstitieller Lungenerkrankung, Raynaud Syndrom, Fieber und seronegativer Arthritis. Bei den meisten ASyS Patienten findet sich ein Myositis-spezifischer Antikörper, der gegen die Aminoacyl-tRNA-Synthetase (AaRS) gerichtet ist. Diese Ligasen spielen bei der Proteinbiosynthese während der Translation eine entscheidende Rolle. Nachdem der Messenger-RNA-Strang (mRNA) nach der Transkription eines bestimmten DNA-Abschnitts im Zytosol an ein Ribosom gebunden hat, beginnt die Translation. An einer Domäne der im Zytosol vorkommenden Transfer-RNA (tRNA) werden die Basentriplets des mRNA-Strangs als Codons erkannt und dem Anticodon entsprechend, wird dann an einer zweiten Domäne eine spezifische Aminosäure gebunden und zu einer Polypeptidkette des Proteins zusammengelagert (siehe **Abbildung 3**). Aufgabe der AaRS ist die Bildung der Aminoacyl-tRNA durch Bindung einer proteinogenen Aminosäure an die jeweilige

tRNA. Im aktiven Zentrum der Quartärstruktur dieser Synthetasen gibt es für ein ATP-Molekül eine spezifische Aminosäure und für den Akzeptorarm einer tRNA eine gemeinsame Bindungsstelle. Dort wird die Aminosäure unter ATP-Verbrauch aktiviert und so die Bindung am 3'-Ende des Akzeptorstamms der tRNA mit dem entsprechenden Anticodon katalysiert (siehe **Abbildung 3**). Im Zytosol gibt es zu jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren jeweils nur eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase, die spezifisch für die Synthesereaktion zuständig ist. Eine weitere Rolle scheinen die AaRS bei der Aminosäurebiosynthese, der DNA-Replikation, dem RNA-Splicing, dem Zellzyklus sowie bei Apoptosevorgängen zu spielen.²³

Die Autoantikörper gegen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen richten sich gegen unterschiedliche Epitope des Enzyms, z.B. Basensequenzen des aktiven Zentrums, das die tRNA-Aminosäure-Bindung katalysiert.²⁴ Da die antigene Zielstruktur häufig die Acylgruppe der jeweiligen Aminosäure beinhaltet (z.B. Histidin, Alanin, Threonyl, o.ä.) wäre es denkbar, dass es 20 verschiedene anti-Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Antikörper (ARS) gibt. Da bei einigen ASyS Patienten bisher keine Antikörper detektiert werden können, ist es gut möglich, dass zusätzlich zu den bereits bekannten acht Autoantikörpern, in Zukunft weitere ARS identifiziert werden.

Unter den acht bekannten ARS ist der anti-Jo1-Autoantikörper (anti-Histidyl) mit einer Prävalenz von 20–25% der häufigste Antikörper unter den MSAs, während der anti-PL-12 (anti-Alanyl) und der anti-PL-7-Autoantikörper (anti-Threonyl) jeweils mit 5% detektiert werden. Die anderen Autoantikörper kommen seltener vor, anti-OJ (anti-Isoleucyl) und anti-EJ (anti-Glycyl) mit <5%, anti-KS (anti-Asparagyl) <1%, anti-Zo (anti-Phenylalanyl) und anti-YRS/Tyr (anti-Tyrosyl) mit <<1%. 1980 wurde der anti-Jo1-Autoantikörper als der erste ARS nachgewiesen. Ergebnisse der Zellfraktionierung und indirekten Immunfluoreszenz-färbung führten zunächst zu der Annahme, dass Jo1 ein antinukleärer Antikörper (ANA) gegen ein azidisches Protein des Kerns sei, ähnlich den bei SLE gefundenen Antikörpern.²⁵ Später wurde entdeckt, dass bei autoimmunen Reaktionen gegen zytoplasmatische und subzelluläre Strukturen ein ähnliches Immunfluoreszenzmuster (sog. gesprenkeltes Muster) wie bei den ANA auftreten kann und die Nachweismethode für die nukleäre Herkunft der Antikörper nicht beweisend ist. Nach weiteren Untersuchungen an immobilisierten anti-Jo1-Autoantikörpern in der Immunaффinitätschromatographie konnte schlussendlich die Histidyl-tRNA-Synthetase aus Rattenleber aufbereitet und als antigene Struktur für diesen Antikörper identifiziert werden.²⁶ Inzwischen gibt es für alle acht Autoantikörper

einen kommerziell erhältlichen Line-Immunoblot Assay (z.B. Euroimmun, Lübeck, Germany).²⁷

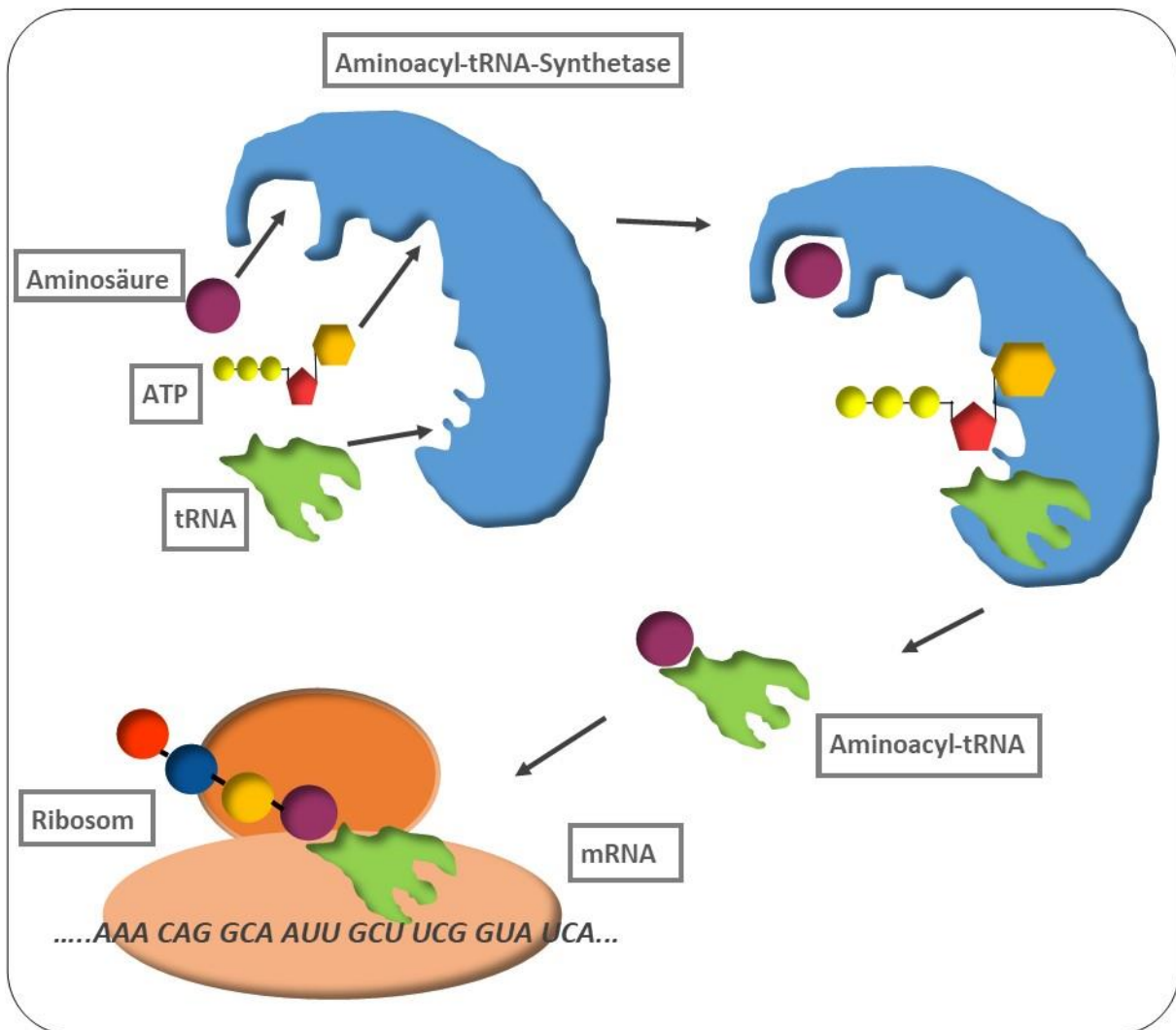


Abbildung 3: Funktion der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (AaRS)

Jede AaRS besitzt spezifische Strukturelemente zur Bindung einer tRNA, der dazu passenden Aminosäure und einem ATP Molekül. Binden diese drei Bestandteile in den jeweiligen Taschen des Enzyms, wird unter Energieverbrauch eine aktivierte Aminoacyl-tRNA gebildet. Im weiteren Verlauf verbindet sich die Aminoacyl-tRNA, an ihrem Anticodon-Arm mit dem Codon einer dazu passenden mRNA, die wiederum an ein Ribosom gekoppelt ist. Das Ribosom katalysiert die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren. So entsteht eine Polypeptidkette und die tRNA ist wieder frei für eine weitere Aminoacylierung an einer zu ihr passenden aaRS.

1.2.1 Epidemiologie

Neben dem Nachweis eines der acht ARS ist die klinische Manifestation für die Diagnose des ASyS entscheidend, genauer gesagt, das Vorkommen von entzündlicher Myopathie und/oder interstitieller Lungenerkrankung (ILD). Die ASyS tritt meist im Erwachsenenalter (mittleres Alter ist das 50. Lebensjahr) auf, kann sich aber prinzipiell in jedem Lebensalter manifestieren. Die Prävalenz aller IIM (DM, PM, IMNM, sIBM, ASyS) liegt bei 6–10:100.000 Einwohnern weltweit. Bei dem bezogen auf die Gesamtzahl seltener auftretenden ASyS, liegt die Prävalenz für den MSA (anti-Jo1), der am häufigsten vorkommt bei ca. 1,2–2,5:1.000.000 Einwohnern weltweit.²⁸

Wie bei vielen anderen rheumatischen Erkrankungen, sind auch bei ASyS Frauen mit einem Verhältnis von 2:1 häufiger betroffen als Männer.²⁷ In einigen Arbeiten hat sich darüberhinausgehend gezeigt, dass die Ethnie eine Rolle spielt. So sind afroamerikanische Patienten scheinbar häufiger von ILD betroffen als weiße Amerikaner. Auch scheinen anti-PL-12-Autoantikörper vermehrt in dieser Bevölkerungsgruppe aufzutreten.^{29,30,31} Zudem findet sich eine Assoziation mit genetischen Variationen, so dass 91% der anti-Jo1-Fälle positiv auf HLA-DR3 und 80% positiv auf HLA-DQ2 getestet wurden, was eine genetische Komponente der Erkrankung impliziert.^{28,15} In der Literatur wird außerdem eine Assoziation des ASyS mit multiplen anderen Erkrankungen beschrieben, wie Sarkoidose³², Myasthenia gravis³³, Spondylitis ankylosans³⁴, Klinefelter-Syndrom³⁵ und Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy (X-chromosomal-rezessiv vererbte neuromuskuläre Trinukleotiderkrankung).³⁶ In einem Fallbericht wird außerdem über eine medikamenteninduzierte Form des ASyS berichtet.³⁷ Die Erkrankung geht mit einer erhöhten Mortalität einher, wobei die 10-Jahres-Überlebensrate 75–89% beträgt. Ein erhöhtes Malignomrisiko scheint nach aktuellen Erkenntnissen jedoch wohl nicht vorzuliegen.³¹

1.2.2 Klinische Manifestation

Die Erkrankung äußert sich bei den Betroffenen auf vielfältige Weise, wobei die Forschungsarbeiten der letzten Jahre darauf hindeuten, dass eine Korrelation zwischen dem nachgewiesenen Autoantikörpertyp (Jo1, PL-7, PL-12, usw.) und dem klinischen Phänotyp (Muskelsymptome, extramuskuläre Organbeteiligung insb. Lungenbeteiligung, Schwere der Erkrankung, Outcome) besteht. Wegen der geringen Fallzahlen anti-OJ, -EJ, -KS, -Zo, -YRS/Tyr positiv getesteter Patienten beziehen sich die Autoren in den Berichten hauptsächlich auf Vergleiche zwischen Patienten, die für

anti-Jo1, -PL-7, -PL-12 positiv getestet wurden, bzw. erreichen nur Vergleiche unter diesen Patienten eine statistische Aussagekraft.^{20,27} Da es bis vor einigen Jahren im klinischen Alltag noch nicht möglich oder flächendeckend üblich war, auf alle acht ARS zu testen, werden in früheren Arbeiten häufig die Kohorten non-anti-Jo1 und anti-Jo1 unter den ASyS-Betroffenen verglichen.^{20,38} Haupterscheinungsmerkmal der meisten Patienten ist typischerweise das isolierte oder gleichzeitige Auftreten von Myositis oder ILD. Die Muskelbeteiligung präsentiert sich sehr heterogen und kann sich asymptomatisch ausschließlich durch serologisch erhöhte CK-Werte äußern, oder mit leichten, bis schweren Myalgien einhergehen. Die ILD (definiert durch eine totale Lungenkapazität (TLC) \leq 60%; eine mittlere forcierte Vitalkapazität (FVC) \leq 60%, eine mittlere Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität (DLCO) \leq 50% im Lungenfunktionstest und/oder Fibrosezeichen im HRCT-Scan) geht mit trockenem Husten, Dyspnoe und pulmonaler Hypertension einher und kann sich zu Beginn der Erkrankung, aber auch erst nach Jahren manifestieren. Sie ist für die Mortalität und Therapierbarkeit der Erkrankung der entscheidende Faktor.^{27,38} Ein gemeinsames Auftreten von anti-SSA/Ro-52-Antikörpern und anti-Jo1-Autoantikörpern stellte sich als negativ bezüglich der Prävalenz einer ILD und begleitender Krebserkrankungen sowie für den gesamten Krankheitsverlauf heraus. Eine Kohortenstudie des Johns Hopkins Institutional Review Board von 2017 konnte ein gehäuftes gleichzeitiges Auftreten von anti-Ro-52 bei anti-Jo1⁺ Individuen bestätigen, die zu einem früheren Zeitpunkt im Krankheitsverlauf von Arthritis, Mechanikerhänden und DM-spezifischen Hautveränderungen betroffen waren. Diese sind: Gottron's Papeln, livides (heliotropes) Erythem und Ödeme der Lider, Erythem des Dekolletés (V-sign) und Nacken (shawl-sign).³¹

Für die Diagnose des ASyS nicht obligat, aber häufige Begleitsymptome sind Fieber, Arthritis (typischer symmetrischer Befall der Handgelenke und Metakarpophalangealgelenke, bei weitgehender Aussparung der Knie, Schultern, Ellbogen und der proximalen Phalangealgelenke²⁸), Raynaud-Syndrom, Hautbeteiligung z.B. Syndrom der Mechanikerhände sowie die Beteiligung von Herz (Perikarditis) und Gastrointestinaltrakt (Reflux, Schluckstörungen).²⁷ Die Zeit zwischen Erstmanifestation und Chronifizierung der Erkrankung kann variieren und zwischen Monaten und Jahren liegen. Wie in Abschnitt 1.1.1 erwähnt, überlappen sich einige Symptome mit andere Erkrankungen wie systemischer Sklerose, Sjögren-Syndrom und den Mischkollagenosen (z.B. Raynaud-Syndrom, Mechanikerhände, Dysphagie).²⁷ Die erste Metaanalyse aus dem Jahr 2014 über eine Antikörper-

spezifische Symptomatik zeigt, dass das klinische Erscheinungsbild bei Patienten mit anti-ARS dem anderer MSA, z.B. anti-PM/Scl, besonders im Hinblick auf die Lungenbeteiligung sehr ähnlich ist. Außerdem gehe mit dem Auftreten von anti-Jo1-Autoantikörpern eine höhere Prävalenz für Muskelsymptome, Arthralgien und Mechanikerhände einher, während non-anti-Jo1⁺- aber ARS⁺ Getestete eher zu Fieber und ILD und weniger Muskelsymptomen neigten.²⁰ In einer Studie, die explizit Patienten mit anti-PL-7-Autoantikörpern im Serum untersuchte, zeigte sich wiederum, dass sich die Prävalenz für Muskelbeteiligung im Vergleich zu den anti-Jo1-Fällen früherer Studien nicht signifikant unterschied. Patienten mit anti-PL-7-Autoantikörpern schienen laut dieser Studie jedoch ein erhöhtes Risiko zu haben, einen Perikarderguß zu bekommen, während ILD als zweithäufigstes Hauptsymptom, anders als zuvor beschrieben, im Vergleich zu anti-Jo1 scheinbar eine weniger große Rolle spielte.^{39,40} Patienten, die positiv für anti-PL12-Autoantikörper getestet wurden, glichen in der phänotypischen Ausprägung der Gruppe Anti-PL-7⁺ Patienten.^{27,41,42} Insgesamt konnten mehrere große Kohortenstudien zeigen, dass sich bei Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern ein schwererer Verlauf besonders hinsichtlich der Myositis manifestiert, die sich teilweise therapieresistent präsentierte, während Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten vermehrt an ILD erkrankten, was sich aber nicht in einer erhöhten Mortalität dieser Krankheitsgruppe im Vergleich zur anti-Jo1-Gruppe widerspiegelte.^{38,27}

1.2.3 ASyS ein Überlappungssyndrom

Wie im Abschnitt 1.2.2 bereits beschrieben, gibt es bei ASyS sowohl Patienten ohne Muskelsymptome (isolierte ILD) als auch Unterschiede in der Ausprägung der Symptome, vergleicht man zwischen den Antikörpersubgruppen. Hamaguchi *et al.* gruppierten ASyS-Patienten je nach Antikörpern in einen myositisassoziierten und einen nicht-myositisassoziierten Anteil. In der einen Gruppe (anti-Jo1⁺, -PL-7⁺, -EJ⁺) konnte bei mindestens 50% der Betroffenen eine Muskelbeteiligung festgestellt werden, die in der zweiten Gruppe (anti-PL12⁺, -KS⁺, -OJ⁺) fehlte.⁴³ So ist es möglich, dass das Antisynthetase-Syndrom nicht nur unter den IIMs eine eigenständige Erkrankung darstellt, sondern dass auch die acht Antikörpersubgruppen durch bestimmte phänotypische Merkmale geprägt sind. Das Wissen über diese typische Ausprägung könnte z.B. zur Voraussage und Vermeidung klinischer Komplikationen und frühen individuellen Therapie dienen. Außerdem könnte vermieden werden, dass Patienten ohne Myositis erst zu spät richtig diagnostiziert und behandelt werden.^{44,45}

Von einem Überlappungssyndrom (engl.: overlap-syndrome) spricht man, wenn eine Autoimmunkrankheit, die sich systemisch (nicht organspezifisch) manifestiert, gleichzeitig die Symptome oder die diagnostischen Merkmale von mindestens zwei klassischen Krankheiten aus dieser Krankheitsgruppe aufweist: systemischer Lupus erythematodes (SLE), systemische Sklerose (Sklerodermie), Dermatomyositis, rheumatoiden Arthritis (RA).²⁷ Zu den gemeinsamen Symptomen gehören z.B. Arthralgie/Arthritis und/oder dieILD sowie das Raynaud-Syndrom oder das Sicca-Syndrom. Definitionsgemäß ist somit das Antisynthetase-Syndrom ein Überlappungssyndrom, welches sich diese Bezeichnung u.a. mit den Mischkollagenosen (Mixed Connective Tissue Diseases MCTD) teilt.⁵ Additiv platzierte Benveniste *et. al.* neben die Patienten, die positiv für einen der acht ARS waren, auch Patienten mit einem der MSA, Anti-U1-RNP, Anti-Ku und Anti-PM-ScL gemeinsam in die Gruppe der „overlap-syndroms“. Passend dazu wurde ihre Ähnlichkeit im klinischen Phänotyp bereits in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, außerdem fand man interessanterweise bei dieser Gruppe auch identische HLA-Haplotypen (HLA-DRB1-0301; DQA1-0501).⁴ Ob diese letztgenannten Overlap Phänotypen ebenfalls ähnliche histologische Bilder aufweisen ist noch nicht im Detail untersucht.

1.2.4 Therapie

Durch die Vielfalt im Auftreten der Symptome und die weitestgehend unklare Pathogenese des ASyS steht eine klare Leitlinie für die Therapie der Erkrankung bisher aus. An immunsuppressiven Therapeutika werden hauptsächlich Steroide und Methotrexat verwendet, die auch bei einer Vielzahl der Patienten zu einer partiellen oder totalen Remission führen. Da dieILD für die Mortalität und Morbidität der Erkrankung hoch relevant ist, wird die Therapieentscheidung stark von der Lungenbeteiligung abhängig gemacht. Es hat sich herausgestellt, dass bei 2/3 der Patienten neben einer initialen Therapie mit Steroiden im Verlauf eine Eskalation mit weiteren Medikamenten aus der Gruppe der DMARDs (Disease-modifying anti-rheumatic drug) nötig ist. Häufig wird Cyclophosphamid, Mycophenolat-Mofetil, Cyclosporin oder Tacrolimus verwendet. In einigen Studien schien die Verwendung von Rituximab in Fällen der Therapieresistenz empfehlenswert. Von einer Verwendung von TNF- α -Blockern wird abgeraten. Häufigste Todesursachen sind u.a. pulmonale Hypertension, Lungenödem, Pneumothorax, Pneumomediastinum und chronisches Lungenversagen. In Anbetracht der fehlenden Leitlinien eines klaren Therapieregimes sind weitere Forschungs- und Konsensarbeiten zu diesem Thema unentbehrlich.

Aktuell ist das sogenannte Evidenzniveau für die Therapieempfehlungen als ‚Expertenmeinung‘ einzustufen. Jüngste Untersuchungen zur Pathogenese der Erkrankung machen z.B. den Einsatz krankheitsspezifischerer Immunmodulatoren (z.B. IFN- α -, BAFF-Blockade) denkbar.^{27,46}

1.2.5 Histologie

Grundsätzlich werden, um eine IIM zu diagnostizieren, die Muskelbiopsien neuro-/myopathologisch auf eine Reihe von Merkmalen hin untersucht. Diese zeigen immunologische Charakteristika, auf welche Weise die Muskelfasern pathologisch verändert und welche Gewebstypen von der Pathologie betroffen sind.^{5,47}

1.2.5.1 Mikro- und Makrostruktur des gesunden Skelettmuskels

Der anatomische Aufbau der Skelettmuskulatur (siehe **Abbildung 4**) umfasst ein Gefüge von parallel angeordneten, lang gestreckten und von Bindegewebshüllen umgebenen, reichlich und hochspezifisch vaskularisierten zylindrisch gebauten Muskelfasern, die ein Synzytium darstellen.

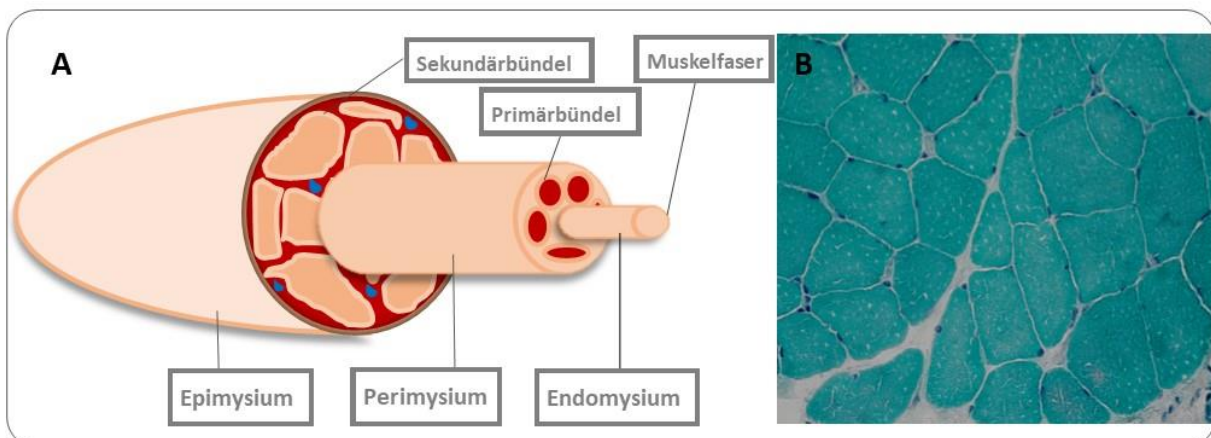


Abbildung 4: Aufbau der Skelettmuskulatur

A: Schematische Darstellung der Bündelung der Muskelfasern in Sekundär- und Primärbündel durch Schichten lockeren Bindegewebes (Epi-, Peri- und Endomysium). **B:** Veranschaulichung der Bündelung im histologischen Querschnitt, in der modifizierten Gömöri Trichrom Färbung. Die Muskelzellen sind in türkis-grün dargestellt, während Zellkerne blau und Bindegewebszüge hellgrün erscheinen. Mitochondrien können in höherer Auflösung (hier nicht sichtbar) als feine rote Punkte identifiziert werden.

Der gesamte Skelettmuskel ist von einer Faszie (straffes Bindegewebe) und darunter liegendem Epimysium (lockeres Bindegewebe) umgeben, welches sich septenartig als Perimysium fortsetzt und ihn in Sekundärbündel (makroskopisch sichtbare „Fleischfasern“) und weitere Primärbündel (ca. 1mm Durchmesser) unterteilt. Die Primärbündel enthalten die parallel angeordneten Muskelfasern und das Endomysium, welches die einzelnen Fasern durch sein retikuläres Bindegewebe stabilisiert.

Blutgefäße und Nerven treten gemeinsam am Hilum durch das Epimysium, die Gefäße teilen sich dann in den bindegewebigen Septen auf und verlaufen geschlängelt als Kapillaren innerhalb der Primärbündel longitudinal zwischen den Fasern.^{48,49}

Histologisch erscheinen die Muskelfasern im Querschnitt als polygonale, dicht beisammen liegende Zellen gleichen Kalibers (ca. 45-80µm Faserdurchmesser), deren Zellkerne (1–8 pro angeschnittener Faser im Querschnitt) physiologischerweise subsarkolemmal liegen. Neben den Muskelzellkernen kann man zwischen den Fasern Kerne von Endothelzellen der Kapillaren sehen. Jede Muskelfaser wird von ca. 2–5 Kapillaren umgeben.⁴⁸

1.2.5.2 Histopathologische Merkmale bei ASyS

Einige pathologische Veränderungen der IIM wurden schon in Absatz 1.1 genannt. Zusammengefasst wird in den Biopsien nach Regeneration, Nekrose, Atrophie der Fasern, Einwanderung von Entzündungszellen, pathologisch veränderter Expression des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I und II, Vakuolenbildung, mitochondrialen Veränderungen und Inklusions- sowie Aggregatbildung gesucht (siehe 3.2.4). Immunhistochemische Färbungen geben weiterhin Aufschluss über Komplementaktivierung, Zytokin- sowie Chemokinaktivierung, zelluläre oder humorale immunologische Vorgänge und beinhalten den spezifischen Nachweis der leukozytären Zelltypen und deren anatomischer Lokalisation. Das umgebende Bindegewebe wird auf Anzeichen von Entzündung, Fragmentierung und Fibrosevorgänge untersucht, die Blutgefäße z.B. hinsichtlich einer Erweiterung des Lumens, Verdickung der Wände oder eines hypoxiebedingten Fehlens.^{5,17} Welche Färbung üblicherweise für die jeweiligen Charakteristika verwendet werden, ist Abschnitt 3.2.4 zu entnehmen.

2000 zeigte Mozaffar *et al.*, dass sich Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern im Serum histopathologisch von Patienten mit anderen Myositisformen unterscheiden. Er stellte dabei fest, dass das Bindegewebe in der H&E-Färbung sowie der enzymatischen Darstellung der alkalischen Phosphataseaktivität (v.a. im Perimysium, aber auch im Endomysium) aufgelockert, stark fragmentiert und fibrotisch verändert war. Entzündungszellen infiltrierten das Gewebe vor allem in diesen Regionen (hauptsächlich Makrophagen und T-Lymphozyten). Die an das Perimysium grenzenden Muskelzellen zeigten Merkmale wie Atrophie (variierender Faserdurchmesser, abgerundete Kontur), Faserregeneration (geringere Größe der Fasern, basophiles Sarkoplasma, teils internalisierte blasige Zellkerne mit sichtbaren

Nukleoli) und Zellkernnekrose (verminderte Zellgröße, mit Verlust der typischen regelmäßigen Polygonalität, scholliges Zytoplasma, Einwanderung von Leukozyten, Verlust der Quer- und Längsstreifung). Im Vergleich zu DM-Patienten konnte eine Erweiterung oder das Fehlen von Blutgefäßen seltener festgestellt werden und es gab keinen Nachweis COX-defizienter Fasern (Hinweis für mitochondriale Veränderungen). Auch bei Patienten mit DM waren perifaszikulär Atrophie und inflammationstypische Merkmale zu finden, sie schienen sich jedoch durch eine mikrovaskuläre und mitochondriale Pathogenese von anti-Jo1⁺ Patienten abzugrenzen.⁵⁰ Typische Charakteristika anderer Myositiden wie geränderte Vakuolen oder ragged red/blue Fasern fehlten bei ASyS. 2011 schlug Pestronk aufgrund der myopathologischen Untersuchungsergebnisse vor, das ASyS, in einer neuen Klassifikation, unter Immune myopathies with perimysial pathology (IMPP) zu gruppieren und als Bindegewebserkrankung zu etablieren. Da er auf eine Mitbeteiligung des Bindegewebes der Lunge schloss, erklärte er sich damit auch die hohe Prävalenz an ILD bei ASyS-Patienten.¹⁷

2014 bestätigte Aouizerate *et al.* die von Pestronk beschriebenen perifaszikulären Muskelfaserveränderungen bei ASyS- und DM-Patienten und legte einen weiteren Fokus darauf, ob ASyS auch hinsichtlich immunhistologischer Veränderungen von der DM abzugrenzen wäre. Betrachtet wurde die Expression des MHC-Klasse-I und -II, sowie die Komplementaktivierung (C5b-9-Färbung) in den betroffenen Regionen im Vergleich zu gesunden Individuen. Die sarkolemmale Hochregulation von MHC-I bei IIM-Patienten im Vergleich zu Gesunden ist ein bekanntes Merkmal und bei Myositiden generell zu finden.⁵¹ Auch Aouizerate *et al.* fand die Expression von MHC-I-Molekülen bei DM und ASyS perifaszikulär betont hochreguliert. MHC-II-Expression und Komplementaktivierung auf dem Sarkolemm perifaszikulärer Muskelfasern war allerdings in den Färbungen bei der ASyS-Kohorte häufiger, während MHC-II bei DM kaum und C5b-9 vermehrt vaskulär zu finden war. Eine Aktivierung des Komplements führten die Autoren auf Zellstress durch nekrotisierende und verletzte Muskelfasern zurück, da sie hauptsächlich nicht-Antigen-vermittelt abläuft.⁶

Das Komplementsystem ist Teil der humoralen Abwehr des angeborenen Immunsystems. Es hat Sensorfunktionen und Effektorfunktionen, die in der Oponierung von Pathogenen, der Auslösung einer lokalen Entzündungsreaktion und der Zerstörung von Pathogenen bestehen. Am Ende einer Kaskade sich gegenseitig durch proteolytische Spaltung aktivierender Komplementfaktoren (C1–9) steht die

Bildung des MAC (Membranangriffskomplex), der dazu fähig ist, die Zellwand von Bakterien zu perforieren und den Keim damit zu lysieren. Dadurch verstärkt das Komplementsystem den Effekt des adaptiven Immunsystems massiv.⁵²

Die MHC-II-Expression sahen die Autoren durch IFN- γ ausgelöst, welches von natürlichen Killer-Zellen (NK) des angeborenen Immunsystems, CD4-positiven T-Zellen (Th1) und CD8-positiven T-Zellen nach Antigenaktivierung produziert wird. Passend dazu konnten in den Biopsien CD8-Zellen gehäuft in der Umgebung der MHC-II-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Somit war eine weitere Abgrenzung des ASyS gegenüber anderen IIM gelungen und weitere Hinweise zur Aufklärung der Pathogenese gewonnen.⁶ Eine weitere Forschungsgruppe zeigte, dass Fasernekrosen der Muskelzellen, die an das Perimysium und teilweise auch Endomysium angrenzen, ein signifikantes Unterscheidungsmerkmal gegenüber den anderen IIM darstellen.⁵³

1.2.5.3 Nukleäre Aktineinschlüsse, ein myopathologisches Charakteristikum

Eine 2015 aus der eigenen Arbeitsgruppe in *Neurology*[®] veröffentlichte Studie bestätigte die typischen histopathologischen Merkmale auch für Patienten mit anti-PL-7-/ und -PL-12-Autoantikörpern. Zudem wurde zum ersten Mal mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Einschlusskörpern und molekularer Diagnostik in der Real-Time-PCR-Analyse die Rolle von nukleärem und zytoplasmatischem Aktin beleuchtet. Ultrastrukturell waren ca. 7 μ m lange nukleäre Einschlusskörper aus Aktinfilamentbündeln (nachgewiesen durch 2G2 Antikörper gegen nukleäres Aktin) zu sehen, die bei 81% der untersuchten ASyS-Patienten und ausschließlich in den Zellkernen von Muskelzellen vorhanden waren. Vereinzelt enthielten die Zellkerne auch I-Bande/Z-Bande/I-Bande-Komplexe (sog. IZI bands) und stäbchen-förmige (rod-like) Strukturen.⁵⁴

Aktin ist ein Protein der Spektrinfamilie und kommt als eines der häufigsten Proteine in allen eukaryotischen Zellen vor. Im Skelettmuskel ist es hauptsächlich für seine Interaktion mit Myosinfilamenten bei der Muskelkontraktion bekannt. In anderen Körperzellen haben Aktinfilamente zahlreiche Aufgaben, wie z.B. als Strukturprotein und intrazelluläres Transportprotein des Zytoskeletts bei der Zellteilung, der Endozytose, der Zellmigration und -adhäsion.^{55,56} Aktin ist ein "dynamisches" Protein, das reversibel als Monomer oder Polymer vorkommen kann. Die globulären Aktinmonomere haben an einer ATP-Bindungsstelle ATP gebunden (G-Aktin). Es kann, unter Hydrolyse des ATP, mit anderen Monomeren zu 7nm dicken,

zweisträngigen und doppelhelikalen Aktinfilamenten polymerisieren (F-Aktin), die jeweils ein (+)- und ein (-)-Ende besitzen. Durch die Hilfe von Aktin-Begleitproteinen können die Filamente zu den unterschiedlichsten Strukturen (z.B. Netze, Bündel, Anker) geformt werden. Es gibt drei Isoformen des Aktins, das muskelspezifische α -Aktin und die ubiquitär vorkommenden Typen β - und γ -Aktin.⁵⁶ Dass Aktin auch im Zellkern verschiedenster Zellen, z.B. den Muskelfasern, vorkommt, ist mittlerweile eine anerkannte Tatsache. Der Nachweis von Aktin in diversen nukleären Komplexen deutet darauf hin, dass es an verschiedensten intrazellulären Abläufen beteiligt ist, inklusive der Transkription, des nukleozytoplasmatischen Transports von Molekülen wie z.B. des mRNA-Strangs, aber auch dem Strukturerehalt des Kerngerüsts und des Chromatins.^{56,57}

Bei durch verschiedene Toxine oder eine Hitzeschockbehandlung ausgelöstem Zellstress konnten *in vitro* nukleäre Aktinbündel und eine erhöhte Translokation von Aktin in den Kern nachgewiesen werden.^{58,59} Dies ist ein evolutionär hochkonservierter Vorgang^{58,60} (Aktin des *Physarum polycephalum* ist zu 95% mit dem menschlichen Aktin identisch) und auch bei inflammatorischen Prozessen zu beobachten. Bei einer Virusinfektion oder während der Differenzierung aktivierter HL-60-Makrophagen transloziert β -Aktin zur Regulation der Transkription vermehrt in den Kern.^{61,62}

Da Aktin keine Kernlokalisierungssequenz (NLS) besitzt, benötigt es zum „shuttling“ die Hilfsproteine Cofilin-2 (CFL2) und Importin-9 (IPO9) für den Import und Profilin-2 (PFN2) und Exportin-6 (XPO6) für den Export (siehe **Abbildung 5**).^{56,57,63} Das Aktinlike Peptide-2/3 (Arp2/3) unterstützt die Polymerisation und Verzweigung von Aktin, um die RNA-Polymerase II, mit der β -Aktin und Arp2/3 den frühen Initiationskomplex bilden, in der Transkription zu regulieren.^{64,65} Arp2/3 wird wiederum von einem Protein aus der Wiskott-Aldrich-Syndrom-Familie (N-WASP) induziert, welches an RNA-Polymerase II gebunden vorliegt und wiederum vom Cytoplasmic protein NCK1 (NCK) aktiviert wird. NCK pendelt zwischen Nukleus und Zytoplasma hin und her und wird bei DNA-Schäden in den Nucleus verlagert.^{54,57}

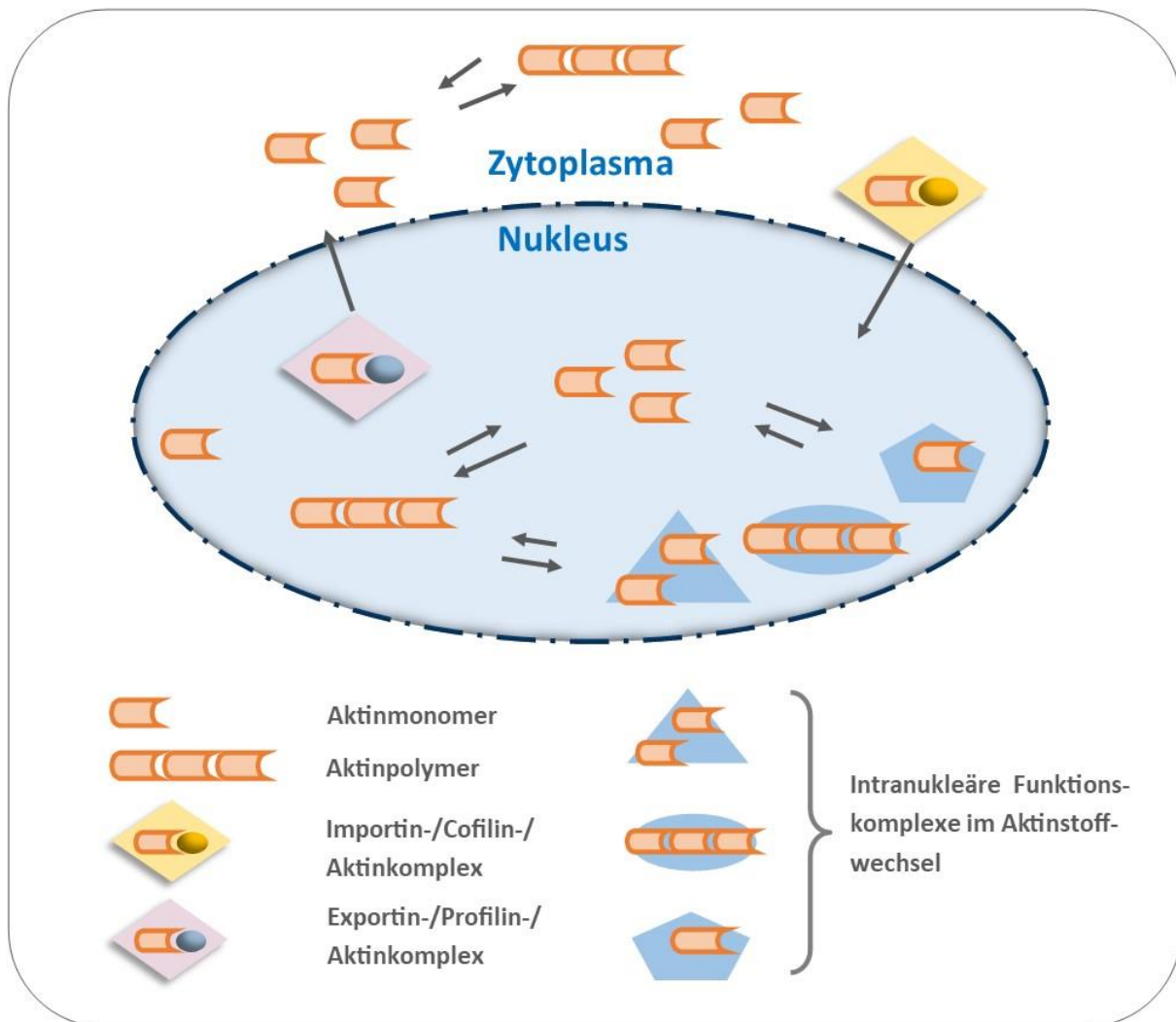


Abbildung 5: Aktinstoffwechsel

Um in den Zellkern zu gelangen benötigen die Aktinmonomere das Hilfsprotein Importin-9, um ihn wieder zu verlassen das Hilfsprotein Exportin-6. Um an die Hilfsproteine gekoppelt werden zu können benötigen die Aktinmonomere für den Import das Adapterprotein Cofilin und für den Export das Adapterprotein Profilin. Im Zytoplasma und im Kern kann Aktin nach Polymerisierung auch als Aktinpolymer vorliegen. Im Kern liegt Aktin außerdem gebunden vor, z.B. an Chromatin, den Transkriptionskomplex oder die mRNA. Dort erfüllt es verschiedenste Aufgaben, was in der Abbildung beispielhaft in den nukleären Funktionskomplexen dargestellt ist.

Welchen Stellenwert die nukleäre Aktinaggregation für die Pathogenese des ASyS hat und ob ihr Auftreten als Kompensationsmechanismus auf den Zellstress verstanden werden kann oder sie selbst eine krankheitsauslösende Rolle spielt, ist noch ungeklärt. In der Real-Time-PCR-Analyse konnte auf molekularer Ebene gezeigt werden, dass bei Patienten mit ASyS die Aktinaggregation und –shuttlingvorgänge regulierenden Proteine im Vergleich zu gesunden Individuen in veränderter Menge vorhanden waren, was vermutlich zu der Bildung nukleärer Aktinstäbchen und -bündel führt.⁵⁴ Das signifikant erhöhte Auftreten der nukleären Aggregate im Vergleich zu gesunden

Menschen und anderen IIM Patienten kann als krankheitsspezifisch für das ASyS gewertet werden.

Während intranukleäre Stäbchenbildung in Muskelzellen (sog. Congenitale Rod-Myopathy) bisher nur bei einigen genetischen Erkrankungen im Kindesalter (u.a. Mutation des α -skeletal-actin (ACTA1)-Gens führt zu Muskelschwäche) nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass bei ASyS eine autoimmun-bedingte Inflammation zu Zellstress und Aktinaggregatbildung im Kern betroffener Zellen führt.^{54,55,66}

1.2.6 Pathophysiologie

1.2.6.1 Das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem kann man grob in einen angeborenen und einen erworbenen Anteil unterteilen, die jeweils einen zellulären und einen humoralen Ast besitzen. Als humoral wird im angeborenen Immunsystem hauptsächlich das Komplementsystem (siehe 1.2.5.2) bezeichnet, während im erworbenen Immunsystem die Antikörper (Neutralisierung von Toxinen, Opsonisierung von Keimen, Komplementaktivierung) als humoral gelten. Zellen des angeborenen Immunsystems sind die sich aus Myeloblasten differenzierenden Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Mastzellen), die sich aus Monoblasten entwickelnden Monozyten (Blutzirkulation) und Makrophagen (Gewebe), sowie die natürlichen Killerzellen (NK). Monozyten und Makrophagen dienen der effektiven Phagozytose z.B. von Pathogenen, stellen professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) dar, sezernieren Effektormoleküle, Chemokine und Zytokine und senden damit z.B. ko-stimulatorische Signale an T- und B-Lymphozyten. Man kann Makrophagen ihrer Differenzierung nach in eine M1- und eine M2-Reihe unterteilen. Unter dem Einfluss von Th1-Zytokinen (IFN- γ , TNF α , LPS) entwickeln sich die proinflammatorischen M1-Zellen, die wiederum proinflammatorische Zytokine (TNF α , IL-1, IL-6, IL-15) und zytotoxische Stoffe sezernieren. Dies führt zur Differenzierung unterschiedlicher T-Helferzellen (siehe 1.2.6.2). Durch Chemokine (CXCL9, CXCL10, CXCL11) können M1-Zellen weitere Th1-Zellen in ihre Umgebung rekrutieren. Unter dem Einfluss von Th2-Zytokinen (IL-4, IL-10, TGF β) entwickeln sich die antiinflammatorischen M2-Zellen. Sie beenden eine Entzündungsreaktion oder wirken immunregulatorisch durch Sekretion von Zytokinen (IL-10, TGF β , IL-1RA) und Wachstumsfaktoren (VEGF, EGF), sowie durch Expression von Endozytose-rezeptoren (z.B. CD206), wodurch ein Remodeling im Gewebe (Fibrosierung, Heilungsvorgänge) induziert wird. Durch Chemokine (CCL17,

CCL18, CCL22, CCL24) können M2-Zellen außerdem Th2-Zellen und Granulozyten rekrutieren.^{67,68,69} NK-Zellen gehören der lymphatischen Zellreihe an, exprimieren aber keinen antigenspezifischen Rezeptor (T- oder B-Zell-Rezeptor) wie die Lymphozyten der erworbenen Immunität. Das Chemokin CXCL12 veranlasst sie zur Diapedese ins Gewebe. Wenn NK-Zellen, nach Bindung am MHC-I-Rezeptor, eine kranke Zelle erkennen, können sie rezeptor- und zytokinvermittelt aktiviert werden und degranulieren. Daraufhin setzen sie das porenbildende Protein Perforin und die Serin-Protease Granzym B frei. Granzym B, eine sog. Caspase (engl. Cysteiny-Aspartate-specific Protease), verursacht die Apoptose der Zielzelle. Zudem sezernieren NK-Zellen $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$, was die Differenzierung von Th1-polarisierten Lymphozyten generiert.^{67,68,69}

1.2.6.2 Das adaptive Immunsystem

Zellulär besteht das erworbene Immunsystem aus den lymphozytären B- und T-Zellen. Die T-Zellen spielen darin und hinsichtlich der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen eine zentrale Rolle. Während der T-Zell-Reifung differenzieren die aus dem Knochenmark stammenden Vorläufer-T-Zellen innerhalb des Thymus unter Ausbildung eines einfach positiven TCR (entweder CD8^+ oder CD4^+), zu noch naiven Progenitor-T-Zellen aus. Im Thymus erfahren sie die Selektionierung. Dabei werden sie auf die Erkennung autoantigener Strukturen geprüft, damit sie zwar die ubiquitär vorhandenen MHC-I-Moleküle und die auf APZ präsentierten MHC-II-Moleküle erkennen, eine Effektorreaktion gegen körpereigene Strukturen aber dennoch vermieden wird. MHC-I-Moleküle sind auf allen kernhaltigen Körperzellen vorhanden und dienen dem Schutz gesunder Zellen vor CD8 -positiven zytotoxischen T-Zellen, sowie der Antigenpräsentation kranker Zellen gegenüber zytotoxischen T-Zellen. MHC-II-Moleküle können v.a. von B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, den APZ, exprimiert werden. Diese präsentieren MHC-II-Moleküle auf der Zelloberfläche, die von CD4 -positiven T-Zellen gebunden und dadurch in mehreren Schritten zu T-Effektor-Zellen aktiviert werden und ausreifen (Th1, Th2, Th17, Treg).⁵² Bindet eine Progenitor-T-Zelle an das in der Antigenbindungsstruktur des MHC-Moleküls präsentierte Peptidfragment einer Thymusepithelzelle mit hoher Affinität, erfährt sie eine Deletion (negative Selektion). Bei fehlender Affinität stirbt die Zelle ab (Apoptose), bei mittlerer bis schwacher Affinität überleben die Zellen (positive Selektion). Dieser Vorgang nennt sich zentrale Toleranz und ist neben der peripheren Toleranz entscheidend für die Vermeidung von

Immunreaktionen gegen den eigenen Organismus. Dies bedeutet aber auch, dass eine Erkennung von Autoantigenen physiologisch möglich sein muss, prinzipiell pathologische Bindungsereignisse jedoch vorkommen können. Je nachdem, ob die T-Lymphozyten von einer Zelle mit einem MHC-I- oder MHC-II-Oberflächenmolekül selektiert wurden, reifen sie zu CD8⁺- bzw. CD4⁺-Zellen aus.⁶⁸

Grundlagen der T-Zellimmunologie

In aller Kürze soll im Folgenden auf einige Grundlagen der T- und B-Zell Immunologie eingegangen werden. Die noch naiven T-Zellen wandern in die sekundären lymphatischen Organe, wo der naive TCR (CD45R) antigenspezifisch aktiviert und transkriptionell modifiziert wird. Wenn das am präsentierenden MHC-Molekül einer Zelle gebundene Antigen an die α - und β -Kette des TCR passt, kommt es zur Bindungsreaktion. Über eine Reihe von co-stimulatorischen Effekten kann dann eine Immunreaktion generiert werden. CD8⁺-Zellen zirkulieren durch die Körperperipherie und benötigen im Vergleich zu CD4⁺-Zellen kein spezielles Mikro-Environment (lymphatisches Gewebe) zur Aktivierung. Eine Bindung an ein pathologisches MHC-I-Molekül und Co-Stimulation durch CD4⁺-Zellen (IL-2) induziert eine Degranulation von Granzymen analog zu NK-Zellen, mit dem Unterschied der Antigenespezifität bei CD8⁺-Zellen. Neben den in 1.2.6.1 genannten Th1- und Th2-Zellen gibt es Th17-Zellen, die u.a. IL-17 sezernieren. Bei einigen Autoimmunerkrankungen wurden vermehrt Th17-Zellen gefunden, zudem hatte eine IL-17-Inhibition auf dieILD (im Mausmodell) antiinflammatorische Wirkung. Man geht allgemein davon aus, dass Th-17-Zellen bei der Genese vieler Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielen.⁷⁰

Grundlagen der B-Zellimmunologie

Eine weitere Zellreihe des adaptiven Immunsystems stellen die B-Zellen dar, die als Plasmazellen (PZ) am Ende ihres Reifungsprozesses zur Bildung von Antikörpern befähigt sind. Während ihrer Entwicklung erleben sie schon im Knochenmark, ähnlich wie die T-Zellen, eine Selektionierungsphase, in der die Zellen mit einem B-Zellrezeptor (BCR), der sich gegen autogene Strukturen richtet, eliminiert werden. Aktiviert werden B-Zellen entweder T-Zell-unabhängig oder klassisch mit T-Zell-Hilfe. Nach Bindung und Co-Stimulation durch eine T-Zelle mit passendem TCR tritt im Lymphfollikel die sog. Keimzentrumsreaktion ein. Es kommt zur klonalen Expansion von B-Zellen mit unterschiedlich konfiguriertem BCR-Immunglobulin (IgM⁺), das

identisch ist mit den Y-förmigen Antikörpern, die später zur gezielten Abwehr gebildet werden. Nur die B-Zellen mit dem BCR der höchsten Affinität zur antigenen Struktur der T-Zelle überleben diesen kompetitiven Prozess (weitere Selektionierung). Proliferations-signale, führen im Keimzentrum zum sog. Isotypenswitch des BCR, d.h. neben IgM können danach IgG-, IgD- oder IgA-Immunglobuline mit erweiterter Effektorfunktion gebildet werden. Aus den aktivierten B-Zellen werden zunächst noch teilungsfähige Plasmablasten, die sich dann zu größeren antikörperproduzierenden (ausgedehnteres endoplasmatisches Retikulum) kurzlebigen Plasmazellen (CD138⁺-Zellen, nicht mehr teilungsfähig) ausdifferenzieren. Nachfolgend entsteht ein Pool an langlebigen B-Gedächtniszellen (meist CD27⁺, kein Isotypenswitch mehr möglich), die bei einem zweiten Kontakt mit dem Antigen schneller zu PZ ausdifferenzieren.⁶⁸

Grundlagen der Plasmazellimmunologie

Bei der Untersuchung von B-Gedächtniszellen wurden drei Charakteristika gefunden, die daran zweifeln lassen, dass sie die einzigen Vertreter des humoralen Immungedächtnisses seien: (1) sie sind nur in der Abwesenheit von Antigenen langlebig, (2) sie teilen sich währenddessen nicht mehr und (3) sie benötigen zur Re-Aktivierung und erneuten Antikörpersynthese als kurzlebige Plasmazellen T-Zell-Hilfe. Die dauerhaft erhöhten Titer nach einer Impfung und den nötigen Schutz bei Re-Infektionen durch die antikörperspezifische Sofortantwort schienen dadurch nicht erklärbar.^{71,72,73} Eher wahrscheinlich ist, dass neben den B-Gedächtniszellen langlebige Plasmazellen existieren, die dauerhaft niedrige Antikörpermengen sezernieren und dadurch den humoralen Ast des immunologischen Langzeitgedächtnisses bilden. Dafür spricht, dass durch B-Zell-Depletion (z.B. durch den Anti-CD-20-Antikörper Rituximab, den Anti-BAFF-Antikörper Atacicept oder indirekt über Th2-Inhibition) nahezu der gesamte Stamm der B-Gedächtniszellen vernichtet wurde, während die Zahl der PZ und die impf- oder infektassoziierten Antikörpertiter unverändert blieben. Auf der anderen Seite wurden nach therapeutischer Stammzelltransplantation bei Patienten mit SLE eine Krankheitsremission, aber ein nahezu kompletter Verlust der impf- und infektassoziierten Autoantikörper sowie des PZ-Bestands gefunden.^{74,75,76} Gewöhnlich gehen kurzlebige Plasmazellen wegen des Zellstress während der Immunreaktion danach in Apoptose (BAX-Aktivierung = Bcl-2-associated Protein X am endoplasmatischen Retikulum). Langlebige Plasmazellen (Expression von anti-

apoptotischem Bcl-2 und niedrigem–keinem FAS-Ligand = Apoptoseinduktion↓) können dies durch Habituation in bestimmten Überlebensnischen umgehen. Nach der Re-Aktivierung von B-Gedächtniszellen bei z.B. Infektion/Impfung entsteht ein kleiner Pool aus Plasmablasten, die Antikörper bilden und zur Migration fähig sind und die durch IFN- γ -Stimulation das lymphatische Gewebe verlassen und in der Blutbahn zirkulieren. Mit ihren Chemokinrezeptoren (CXCR3, CXCR4) können sie dann an Chemokinliganden binden, die von Zellen in entzündlichen Geweben oder dem Knochenmark (CXCL9/10/11 oder 12) exprimiert werden. Dort verlieren sie die Fähigkeit zur Migration und werden zu langlebigen antikörper– und zytokinproduzierenden PZ (CD19⁻, CD38^{high}, CD138⁺). Physiologisch bilden sich entzündliche Gewebe als Überlebensnische für diese PZ nach der Immunreaktion zurück, nur im Knochenmark bleibt ein dauerhafter Bestand erhalten. Bei jeder neuen Immunreaktion durch B-Gedächtniszellen wird ein kleiner Teil der langlebigen PZ durch eine neue Generation an Plasmablasten ersetzt und somit der Gesamtbestand stabil gehalten. Dadurch wird die humorale Langzeitimmunität in ihrer Spezifität (PZ gegen neue Antigene) erweitert. Wichtig für das Überleben und Ausdifferenzieren der langlebigen PZ ist neben der CXCL12/CXCR4-Bindung für das „homing“ die Stimulation mit BAFF (B-lymphocyte Stimulator), APRIL (A Proliferation Inducing Ligand) und/oder IL-6 durch das Zielgewebe.^{75,77,78}

1.2.6.3 Selbsttoleranz und Autoimmunität

Eine Disposition der HLA-Allele zur Entwicklung von ASyS wurde bereits im Abschnitt 1.2.3 beschrieben. Da jedoch nicht jeder mit dieser HLA-Disposition auch erkrankt, liegt es nahe, dass weitere Faktoren (exogener oder endogener Natur) an der Pathogenese beteiligt sind. Wird die Proteinstruktur z.B. durch Medikament-, Toxin- oder Virusbelastung verändert, kann es dazu kommen, dass ein verändertes Peptidfragment prozessiert und von APZ präsentiert wird, gegen das keine zentrale Toleranz erzeugt wurde. Infolgedessen wären Immunreaktionen gegen körpereigene Strukturen denkbar (substanzvermittelte Autoimmunreaktionen).⁷⁹ Virale Peptide können zudem Ähnlichkeit mit autologen Strukturen haben, z.B. selektiv im Gelenk, Herz oder Pankreas präsentierte Peptide. Bedingt die HLA-Ausstattung, dass diese Peptide präsentiert werden, kann es zur Kreuzreaktivität gegen körpereigenes Gewebe kommen (sogenannte 'Molekulare Mimikry'). Es gab mehrere Forschungsarbeiten, die eine solche Mimikry, ausgelöst durch eine EMCV- (Encephalomyokarditisvirus) oder eine Coxackievirusinfektion, auch für das ASyS

ursächlich sahen.⁸⁰ Miller und Waite hingegen befanden wenig später bei genauer Untersuchung der anti-Jo1-Autoantikörper, dessen ursprüngliches Antigenepitop sie ausschließlich in humanen Strukturen sahen, diesen Zusammenhang als wenig wahrscheinlich.⁸¹

Die Toleranz gegenüber Autoantigenen wird bei B- und T-Zellen zentral durch Selektionierung im Knochenmark und Thymus kontrolliert. Peripher wird sie in beiden Fällen durch variable co-stimulatorische Effekte, durch limitierten Zugang der B-Zellen zu adäquater T-Zell-Hilfe, und durch kompetitive Ausreifung im Keimzentrum gesteuert, außerdem gibt es jeweils Populationen regulatorischer B- und T-Zellen (CD23⁺, CD25⁺).⁶⁸

Rolle der B-Zellaktivierung

Studienergebnisse zeigen, dass es während der Maturation dennoch (auch bei gesunden Menschen) in bis zu 20% der Fälle zur Entstehung autoreaktiver B-Zellen kommt.⁸² Trotzdem entwickelt nicht jeder dieser Menschen eine Autoimmunerkrankung. Weitere Faktoren, die die periphere Toleranz einschränken, wie eine fehlregulierte T-Zell-Hilfe, Fehler bei der genetischen Umstrukturierung während der Hypermutation und eine Überexpression von BAFF und APRIL sowie ihren Rezeptoren, wurden im Mausmodell als krankheitsauslösend beschrieben.^{83,84,85} Forschungsarbeiten zu SLE und rheumatoider Arthritis (RA) konnten zeigen, dass möglicherweise autoreaktive Plasmablasten freie Nischen in entzündetem Gewebe und Knochenmark besiedeln und dort zu autoreaktiven PZ ausdifferenzieren.⁸⁶ Eine Überexpression von CXCL12 und BAFF in entzündlichem Gewebe wie Nieren, Haut oder Gelenken bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen während eines Schubs (definiert durch B-Zell-Hyperaktivität mit folgender Autoantikörpertitererhöhung) unterstützen diese These.⁷⁶ Denkbar wäre also, dass autoreaktive PZ in Überlebensnischen überdauern und dort unabhängig von einer B-Zell-Aktivierung durch Autoantikörpersekretion die Autoimmunerkrankung unterhalten und chronifizieren. Dies wäre auch bei entzündlichem Muskelgewebe bei ASyS denkbar. Bei vielen antikörpervermittelten Autoimmunerkrankungen (SLE, Sjögren-Syndrom, RA) konnte eine Korrelation zwischen den Antikörpertitern, dem Schweregrad der Erkrankung und den BAFF-Serum-Werten festgestellt werden. Kryštůfková *et al.* und später Stone *et al.* zeigten, dass dies auch für anti-Jo1-Autoantikörper gilt. Die Höhe der Serum-CK-Werte, der Anti-Jo1-Titer und die klinische Beeinträchtigung der

Muskelkraft und der Lungenfunktion verhielten sich gerade im Anfangsstadium der Erkrankung verhältnismäßig zu den BAFF-Serum-Werten. Besserten sich die Symptome oder waren aufgrund der Therapie mit Glukokortikoiden keine anti-Jo1-Autoantikörper mehr nachweisbar, sanken auch die BAFF-Werte der Patienten.^{24,87} Ebenso konnte eine Studie abfallende anti-Jo1-Autoantikörper-Titer nach B-Zell-Depletion durch Rituximab mit einer Remission der Erkrankung in Verbindung bringen.⁸⁸ Zum einen kann man sich mit dieser Information BAFF- und/oder anti-Jo1-Autoantikörper-Serum-Werte zukünftig als mögliche Biomarker der Krankheitsschwere zu Nutze machen, zum anderen wird eine die B-Zelllinie betreffende antikörpervermittelte Pathogenese denkbar.

Rolle zytotoxischer T-Zellen und Proinflammation

Casciola-Rosen und Rosen äußerten den Verdacht einer immunpathogenen Beteiligung zytotoxischer T-Zellen, die bei ASyS wie in Abschnitt 1.2.5.2 erwähnt neben Makrophagen gehäuft in den betroffenen Muskelregionen vorkommen. Sie zeigten, dass bei autoantikörperassoziierter Myositis vor allem Muskelfasern, die sich in Regeneration befinden, große Mengen MSA sezernieren, während benachbarte nicht betroffene Muskelregionen dies kaum tun. Bei einer Muskelverletzung und darauffolgender Regeneration wandern Vorläuferzellen, sogenannte Satellitenzellen, in den Muskel ein, differenzieren zu proliferativen Myoblasten, um sich dann zu Myotuben zusammenschließen (Vorgänger der Myozyten). Im Gegensatz zu den Myozyten exprimieren Myotuben Markerproteine unreifer Zellen z.B. MHC-I-Moleküle oder Proteine, die in DNA-Reparaturmechanismen involviert sind. Da bei diesen regenerativen Vorgängen auch immer Immunzellen involviert sind und zytotoxische CD8⁺-Zellen auf MHC-I-Moleküle reagieren, wäre die Entstehung autoreaktiver Immunzellen während dieses Schaden-Reparatur-Vorgangs und damit assoziierter Signalkaskaden denkbar.⁸⁹ In zahlreichen Forschungsprojekten wurde auf unterschiedliche Weise versucht, die Erkrankung in diversen Mausmodellen zu erzeugen, um die Pathogenese zu untersuchen.⁹⁰ Vielfach konnte die Beteiligung des adaptiven Immunsystems und vor allem antigenspezifischer T-Zellen bestätigt werden. Fernandez *et al.* zeigten jedoch, dass das angeborene Immunsystem einen ebenso wichtigen, wenn nicht sogar ursprünglicheren Einfluss auf die der Krankheitsentstehung hat. TLR4- oder TLR2-Rezeptoren (Toll-like-Rezeptoren) spielen bei der

Aktivierung des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle und sie stellten die Hypothese auf, dass anti-Jo1-Autoantikörper mit TLR-Rezeptoren interagierten.⁹¹ Für die Initiation einer Immunreaktion ist immer auch ein „Gefahrensignal“ nötig. Diese Hürde zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung sehen die meisten Autoren in einem mechanischen, infektiösen oder immunologischen Insult des Muskelgewebes bedingt, dem sogenannten „Danger Model of Immunity“.⁹⁹ Dieses könnte beispielsweise eine im Körper gewöhnlich verborgene, aber durch oben beschriebenen Prozess für Immunzellen zugänglich gemachte körpereigene Struktur sein. Ein bekanntes „Gefahrensignal“, das die Ausschüttung löslicher HRS über eine Interaktion mit TLR induzieren könnte, ist Typ-I-IFN (IFN- α). Eine Hochregulation von Typ-I-IFN (proinflammatorische Wirkung mit M1-Aktivierung) im Muskel DM- oder PM-Erkrankter wurde in der Literatur häufig beschrieben. Die MHC-I- und MHC-II-Expression in betroffenem Muskelgewebe bei ASyS wird vermutlich durch Typ-II-IFN (IFN- γ) induziert.⁶ Außerdem konnte eine Korrelation zwischen IFN- γ -Serumwerten und der Krankheitsaktivität gezeigt werden.¹⁰⁰ Einem exo- oder endogenen Reiz (Virus, UV-Strahlung, oxidative Sauerstoffspezies, nekrotisches Gewebe) folgend, wird hauptsächlich von NK- und NKT- Zellen Typ-I-IFN sezerniert, welches wiederum die Th1-Differenzierung und Bildung großer Mengen an BAFF stimuliert und dadurch zur Überwindung der Selbsttoleranz mit Bildung von Autoantikörpern führen könnte. Eloranta *et al.* konnten zeigen, wie, möglicherweise rückgekoppelt, eine durch anti-Jo1-Autoantikörper-Komplexe ausgelöste Ausschüttung von Typ-I-IFN diesen Mechanismus aufrecht erhält.¹⁰¹ Durch IFN- α induzierte vermehrte MHC-I-Expression auf den Muskelzellen könnte diese zur Zielstruktur der Immunreaktion machen.^{102,103} Letztlich ist nicht abschließend geklärt welcher „Typ“ von Interferonantwort bei der Myositis im ASyS-Kontext eine Rolle spielt.

AaRS und ARS als intrinsische Chemokine

Weiterhin wurde beschrieben, dass einige der Autoantikörper wie auch die tRNA-Synthetasen selbst die Fähigkeit besitzen, als intrinsische Zytokine oder Chemokine über Bindung an Zytokin- und/oder Chemokinrezeptoren (CCR5, CCR3 und CD86) Immunzellen zu aktivieren oder Zellmigration auszulösen.⁹² Auch wurden im entzündeten Muskelgewebe Ansammlungen von Immunzellen mit besagtem Rezeptorbesatz und damit einhergehende co-stimulatorische Chemokine (CCL2, CCL3, CCL4) nachgewiesen.⁹³ Eingewanderte APZ könnten nach Meinung der

Autoren dann eine Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem schlagen. Indem die APZ nach der Antigenprozessierung anti-Jo1-spezifische CD4⁺-Effektor-T-Zellen über MHC-II stimulierten, die wiederum die Entstehung von antigenspezifischen B-Effektorzellen sowie myozytotoxischer CD8⁺-Zellen begünstigten. Als eine Möglichkeit, wie in einem solchen Fall die Toleranz gegen „selbst“ verloren gehen könnte, wurde die Spaltung der tRNA-Synthetasen durch Granzym B gesehen. Es konnte bestätigt werden, dass Granzym B, von zytotoxischen-T-Zellen und NK-Zellen sezerniert, auch tRNA-Synthetasen spaltet und zwar an unüblichen Stellen der Peptidstruktur. Bei der Phagozytose und Präsentation könnten so Fragmente (sog. kryptische Epitope) auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen von T-Zellen erkannt werden, gegen die sie aber im Thymus keine Toleranz entwickelt hatten, da die Peptidsequenz der Epitope im Körper für gewöhnlich okkult vorliegt.^{23,94} Levine *et al.* beschrieben diesen Vorgang als auf sog. Mikroumgebungen im Körper begrenzt. So fanden sie heraus, dass HRS nur in bestimmten Strukturkonformationen (Alpha-helikale Coiled-Coil-Struktur) von Granzym B gespalten werden und diese z.B. pH-Wert-abhängig sind. In der Lunge von Patienten mit ASyS und ILD wurden im Gegensatz zu Gesunden und ebenso zu Muskelgewebe große Mengen Granzym-B-spaltbare HRS gefunden. Das führte zur Annahme, dass die Lunge das Initiatororgan der Erkrankung und der Muskel möglicherweise erst sekundär betroffen sei.⁹⁵ Strukturanalysen der HRS zeigten, dass zwei Splicevarianten des Enzyms, (i) mit Anti-Jo1-Autoantikörpern kreuzreagieren, (ii) bei Patienten mit antikörperassoziierter Myositis gehäuft im Serum vorkommen und (iii) proinflammatorisch auf die Umgebung wirken.⁹⁶ Weitere Studien zeigen, dass möglicherweise eine Fehlregulation des Lungenendothels durch fehlendes IFN- γ zur Fibrosierung führte.⁹⁷ Dies unterstützt die These einer im Lungengewebe initiierten Autoimmunerkrankung mit Autoantikörperbildung, die aus dieser Nische durch proinflammatorische Signale aufrechterhalten wird und sekundär den Muskel befällt.⁹⁸

Trotz nicht gänzlich geklärter Pathogenese des ASyS, scheint ein krankheitsspezifisches Zusammenspiel von angeborenem und adaptivem Immunsystem in verschiedenen Entzündungsnischen des Körpers eine Rolle zu spielen. Infolge kommt es zur Bildung unterschiedlicher MSA, die weiterhin den Phänotyp der Erkrankung zu bestimmen scheinen.

1.3 Ziel des Forschungsprojekts

Die Einschätzung des ASyS als Subgruppe der IIMs unterlag in den letzten Jahrzehnten ständigen Veränderungen. Wie einleitend geschildert, wurde bereits einiges über Homogenität und Heterogenität des Krankheitsbildes beschrieben. Das bislang aber noch keine vergleichenden Studien durchgeführt wurden, welche sich mit den zugrundeliegenden immunologischen Prozessen, sowie den morphologischen Gegebenheiten bei Patienten mit verschiedenen ASyS-definierenden Autoantikörpern beschäftigten, gab Anstoß zu weiteren Nachforschungen. Für mich ergaben sich daraus folgende Fragen:

Lassen sich, wie es sich in früheren Forschungsprojekten, die ILD und Myopathie betreffend, bereits abzeichnet klinische und/oder laborchemische Unterschiede bei den Patienten der jeweiligen Antikörpersubgruppe (Jo1/PL-7/PL-12) identifizieren?

Lässt sich die Myositis bei ASyS histomorphologisch einheitlich diagnostizieren?

Gelten die für anti-Jo1⁺ Patienten gefundenen morphologischen Merkmale der Myositis auch für Patienten mit Anti-PL-7- und Anti-PL-12-Autoantikörpern, beziehungsweise in wie weit sind die verschiedenen ASyS-assoziierten Myositiden im histologischen Bild vergleichbar oder identisch?

Lassen sich bestimmte immunologische Profile der adaptiven und angeborenen Immunität bei den verschiedenen ASyS-assoziierten Myositiden identifizieren?

Spielen langlebige Plasmazellen, wie bereits in der, für andere Autoimmunerkrankungen (RA, SLE) beschriebenen Pathogenese, auch bei ASyS eine Rolle?

Basierend auf diesen Fragen entwickelten sich hier 3 zentrale Hypothesen, für deren Beantwortung verschiedene histologische Färbemethoden und Untersuchungen auf molekularer Ebene (siehe Methodenteil) herangezogen wurden:

Hypothesen:

1. Wie in diversen Studien der letzten Jahre nachhaltig beschrieben, kann davon ausgegangen werden, dass es antikörperassoziierte Unterschiede den klinischen Phänotyp betreffend gibt. Demgegenüber gibt es einige wenige Untersuchungen, die eine homogene Histomorphologie in den Gruppen beschreiben. Ich stelle daher die Hypothese auf, dass die Differenz der antikörperspezifischen klinischen Merkmale (e.g. Muskel- und Lungenbeteiligung) in den Patientenpopulationen nicht wesentlich von divergierenden histopathologischen Merkmalen widerspiegelt wird. Neben der Evaluation der klinischen Historie der Patienten standen zur Erhärtung dieser

Annahme, selbst hergestellte, standardisierte histologische Färbungen, sowie immunhistologische bzw. Immunfluoreszenzfärbungen zur Verfügung.

2. Alle ASyS-assoziierten Myositiden haben das Vorhandensein eines Myositis-spezifischen Autoantikörpers (anti-Jo1, -PL-7, -PL-12, -EJ, -OJ, -KS, -Tyr und -ZO) gemeinsam. Ob diese, gegen das im Zytosol vorkommende Enzym Aminoacyl-tRNA-Synthetase gerichteten Autoantikörper eine pathogenetische Rolle spielen, beziehungsweise welche immunologischen Prozesse bei der Erkrankung im Gesamten stattfinden ist bisher weitestgehend ungeklärt. Die für ASyS spezifischen Autoantikörper geben Anlass zur Hypothese einer in den Antikörpergruppen identisch verlaufenden Immunpathogenese. Zur Untersuchung des immunologischen Profils wurden neben immunhistochemischen Färbungen auch qPCR Analysen von Zytokinen, Chemokinen und weiteren die Immunantwort regulierende Faktoren, zur Quantifizierung des Genprodukts angefertigt.

3. In Forschungsarbeiten der letzten Jahre wurde langlebigen Plasmazellen, als Dauerproduzenten von Autoantikörpern, eine Rolle bei der Entstehung von RA, dem Sjögren Syndrom und dem SLE zugesprochen.^{104,76} Ebenso wurde postuliert, dass ASyS mit Erkrankungen wie SSc, SLE oder RA überlappende Phänomene präsentiert.²⁷ Dies bringt mich zu der Hypothese, dass auch dem ASyS ein Plasmazell-assoziiertes Pathomechanismus zugrunde liegt, der durch eine in der Muskulatur befindliche Überlebensnische, der dauerhaft Autoantikörper bildenden Plasmazellen, zu einem chronischen Krankheitsbild der verschiedenen typischerweise betroffenen Organsysteme führt. Um den Prozess der Entstehung einer solchen Nische im Muskel zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzdoppelfärbungen angefertigt. Zusätzlich wurden Moleküle/Aktivatoren für die Differenzierung von B- und Plasmazellen auf molekularer Ebene durch qPCR analysiert.

2 MATERIAL

2.1 Allgemeine Chemikalien

Tabelle 2: Allgemeine Chemikalien

Produkt	Hersteller/Händler
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	JT Baker, Center Valley, USA
Glykogen UltraPure RNase-frei 20µg/µl	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Isopropanolol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Reagenzien für die Histologie

Tabelle 3: Reagenzien für die Immunhistologie

Produkt	Hersteller/Händler
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eosin-Y	Brunschwig Chemie, Amsterdam
Ethanol	JT Baker, Center Valley, USA
Grams Kristallviolett, Fertiglösung (FCS)	PAA, Paschin, Österreich
Lugols Lösung, Fertiglösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämatoxylin Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Normales Kaninchenserum	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Normales Ziegenserum	Vector Laboratories, Burlingame, USA
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
ROTI-HISTOKITT II Einschlussmittel	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue Tek	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham
Xylol	JT Baker, Center Valley, USA
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA

2.3 Antikörper

Tabelle 4: Primäre Antikörper

Produkte	Klone	Spezifität	Verdünnung	Hersteller/Händler
CD4	SP35	Kaninchen anti Mensch	1:100	Zymed, Österreich
CD8	C8/114B	Maus anti Mensch	1:100	DAKO, Deutschland
CD20	L26	Maus anti Mensch	1:400	DAKO, Deutschland
CD45	2B11	Maus anti Mensch	1:400	DAKO, Deutschland
CD56	monoclonal	Maus anti Mensch	1:200	GeneTex Inc, USA
CD68	KP1	Maus anti Mensch	1:100	DAKO, Deutschland
CD138	MI15	Maus anti Mensch	1:50	DAKO, Deutschland
C5b-9	aE11	Maus anti Mensch	1:200	DAKO, Deutschland
MHC class I	W6/32	Maus anti Mensch	1:1000	DAKO, Deutschland
MHC class II (antiHLA-DM)	CR3/43	Maus anti Mensch	1:100	DAKO, Deutschland
MHCneonatal	NB-MHCn	Maus anti Mensch	1:20	Novocastra, Großbritannien
MHCdevelopmental	NCL-MHCd	Maus anti Mensch	1:5	Novocastra, Großbritannien

MUM1Protein	MUM1p	Maus anti Mensch	1:50	DAKO, Deutschland
CXCL12/ SDF-1	MAb79018	Maus anti Mensch	1:100	R&D Systems, USA
CXCL13	polyclonal	Ziege anti Mensch	1:100	R&D Systems, USA
CXCR4	UMB2	Kaninchen anti Mensch, anti Ratte, anti Maus	1:50	Abcam, Großbritannien

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper

Produkte	Spezifität	Verdünnung	Hersteller/Händler
AF647	Ziege anti Kaninchen	1:100	Jackson Immuno Research, Camebridge, Großbritannien
AF488	Ziege anti Kaninchen	1:100	Invitrogen, Carlsbad, USA
AF488	Ziege anti Maus	1:100	Invitrogen, Carlsbad, USA
Cy3	Ziege anti Maus	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland
POD	Ziege anti Kaninchen	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland
POD	Kaninchen anti Ziege	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland
POD	Ziege anti Maus	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.4 PCR-Sonden

Tabelle 6: TaqMan-Sonden von Life Technologies, Deutschland

TaqMan Gene Expression Assay	Referenznummer
<i>Acta1</i>	Hs00559403_m1
<i>APRIL (TNS13)</i>	Hs00182565_m1
<i>ARP2</i>	Hs00855199_g1
<i>BAFF (TNSF13B)</i>	Hs00198106_m1
<i>ACTB</i>	Hs99999903_m1
<i>CD206</i>	Hs00267207_m1
<i>CCL17</i>	Hs00171074_m1
<i>CCR3</i>	Hs00266213_s1
<i>CCR6</i>	Hs01890898_s1
<i>CCR7</i>	Hs01013469_m1
<i>CCR10</i>	Hs00706455_s1
<i>CFL2</i>	Hs00368395_g1
<i>CXCL12</i>	Hs03676656_mH
<i>CXCL13</i>	Hs00757930_m1
<i>CXCR4</i>	Hs00607978_s1
<i>CXCR5</i>	Hs00540548_s1
<i>CXCR6</i>	Hs01890898_s1
<i>XPO6</i>	Hs00385137_m1
<i>IFNA</i>	Hs00265051_s1
<i>IFNG</i>	Hs00989291_m1
<i>IL1B</i>	Hs01555410_m1
<i>IL4</i>	Hs00929862_m1
<i>IL4R</i>	Hs00166237_m1
<i>IL6</i>	Hs00985639_m1
<i>IL12</i>	Hs01011518_m1
<i>IL17</i>	Hs00174383_m1
<i>IL21</i>	Hs00222327_m1
<i>IPO9</i>	Hs00216375_m1

<i>NCK</i>	Hs01592377_m1
<i>NWASP</i>	Hs00187614_m1
<i>PGK1</i>	Hs99999906_m1
<i>PFN2</i>	Hs00160050_m1
<i>STAT1</i>	Hs01013989_m1
<i>STAT2</i>	Hs01013123_m1
<i>STAT3</i>	Hs00374280_m1
<i>STAT6</i>	Hs00598625_m1
<i>TGFB</i>	Hs00998133_m1
<i>TNFA</i>	Hs00174128_m1

2.5 Kommerzielle Kits und Enzyme

Tabelle 7: Kommerzielle Kits und Enzyme

Produkt	Hersteller/Händler
2xRed PCR Mastermix	Startec, Birkenfeld, Deutschland
DAKO ARK KIT Peroxidase K3954	DAKO, Hamburg, Deutschland
DNase free Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
High-Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Liquid DAB+ Substrat Chromogen System	DAKO, Hamburg, Deutschland
peqGOLD TriFast	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
SurPrep Nuclear or Cytoplasmic RNA Purification Kit	ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

2.6 Laborausüstung und Hilfsmittel

Tabelle 8: Laborausüstung und Hilfsmittel

Produkt	Hersteller/Händler
Kryostat Cryo-Star Microm HM560	Microm, Walldorf, Deutschland
Microplate Reader TECAN Infinite 200	Tecan, Grödig, Österreich
PCR-Thermocycler Uno-Cycler	VWR, Darmstadt, Deutschland
Real-Time PCR System 7900 HT	Applied Biosystems, Foster City, USA
Zeiss Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland
VWR® Disposable Pellet Mixers and Cordless Motor	VWR International, Strafford, PA, USA
Zeiss P902 Elektronenmikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland

3 METHODEN

3.1 Patientendaten

3.1.1 Angaben zum Patientenkollektiv

In die Studie wurden insgesamt 39 Patienten aufgenommen. 16 Patienten entstammen dem Diagnostikpool des Instituts für Neuropathologie der Charité in Berlin. Muskelproben und klinische Daten von 15 Patienten wurden vom Partnerkrankenhaus Hôpital La Pitié Salpêtrière in Paris und 8 Patienten vom Hospices Civils in Lyon zur Verfügung gestellt. Einschlusskriterium war der positive Antikörpernachweis eines der drei ARS, Anti-PL-7 (n=10), -PL-12 (n=13) oder -Jo1 (n=16), sowie die oben genannten morphologischen Kriterien (siehe 1.2) Ausschlusskriterien waren der fehlende Nachweis eines der drei o.g. ARS oder der Nachweis zweier unterschiedlicher ARS bei einem Patienten. Zusätzlich mussten 6 Patienten von der histologischen Bewertung ausgeschlossen werden, da die Biopsien lagerungsbedingte Schäden aufwiesen und eine Evaluation entsprechend nicht mehr möglich war. Die statistische Auswertung der Histologie umfasste somit 33 Patienten: PL-7 (n=9), PL-12 (n=13) Jo1 (n=11). Dem Patientenkollektiv wurden 11 Normalkontrollen/ non disease controls (NDC) gegenübergestellt, deren rein subjektive Muskelsymptomatik zur Biopsieentnahme geführt hatte. Ausschlusskriterien waren ein positiver Antikörpernachweis eines MSA oder MAA, erhöhte Entzündungswerte und/ oder CK-Werte sowie pathologische Veränderungen in der Muskelbiopsie. Es mussten nachträglich 3 NDC von der statistischen Bewertung ausgeschlossen werden, da entscheidende Laborwerte erhöht waren (CK, CRP). Die Einwilligungserklärung wurde von allen Patienten vor Studienaufnahme eingeholt und alle Prozeduren fanden in Übereinstimmung mit der Helsinki-Erklärung statt. Zudem bewilligte die Ethikkommission der Charité die Studie (EA1/204/11 und EA2/163/17).

3.1.2 Auswertung der Patientendaten

Eine Korrelation der klinischen Daten im Vergleich zum Schweregrad im Scoring in der Histopathologie erfolgte nur gruppenübergreifend nach jeweiligem Autoantikörper. Ebenfalls wurde über einzelne Patienten keine Statistik erhoben, die den klinischen Schweregrad (Dauer der Erkrankung, durchgeführte Therapie, Laborwerterhöhung von CK oder CRP) mit Veränderungen der Genexpression vergleicht. Dies ist hauptsächlich der geringen Kenntnis über die klinischen Parameter/ Verläufe Einzelner geschuldet, welche durch die retrospektive Herangehensweise in vielen Fällen

unbekannt ist (siehe 5.4). Entsprechend wäre eine Auswertung statistisch nicht sinnvoll gewesen und sollte in zukünftigen Untersuchungen durch eine andere Herangehensweise bedacht werden (z.B. durch entsprechende Fragebögen während der Studiendurchführung. Vergleiche auch 5.4).

Die statistische Auswertung im Sinne des parameterfreien H-Tests nach Kruskal und Wallis mit anschließender Dunn Korrektur sollte, die klinischen Daten betreffend, allerdings mit Vorsicht betrachtet werden. Da die Laborwerte oft nur als „normal“ ohne konkreten Zahlenwert übermittelt wurden, dezimierten sich die Fallzahlen erneut, bzw. konnte kein Vergleich zu NDC hergestellt werden, da dort alle Werte in der Norm lagen. Für die statistische Berechnung ergaben sich folgende Fallzahlen:

CRP-Werte: PL-7 (n=3), PL-12 (n=10), Jo1 (n=10), NDC (n=0)

CK-Werte: PL-7 (n=10), PL-12 (n=12), Jo1 (n=11), NDC (n=0)

3.2 Histologie

3.2.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Muskelproben wurden nach der Entnahme bei -80°C im Institut für Neuropathologie der Charité in Berlin oder den Partnerkrankenhäusern Hôpital La Pitié Salpêtrière in Paris bzw. Hospices Civils in Lyon cryo-asserviert. Zur Anfertigung der histologischen Färbungen wurden am Microtom Cryo-Star HM 560' (Microm Laborgeräte, Deutschland) 7-8 µm dünne Schnitte angefertigt und diese auf Objektträger aufgebracht. Nach einer 24-stündigen Trocknungszeit bei 4°C wurden die Objektträger bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Zur Erhebung der in 3.2.4 genannten Scores wurden folgende Färbungen angefertigt. Konventionell histologisch und enzymhistochemisch wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, die Gömöri-Trichrom-Färbung, die Elastika-van-Gieson-Färbung, die Oil-Red-O-Färbung, die Saure-Phosphatase-Färbung, die Unspezifische-Esterase-Färbung, die NADH-Färbung, die SDH-Färbung, die Cox-Färbung und die Alkalische-Phosphatase-Färbung durchgeführt (Romeis).¹⁰⁵

Immunhistochemisch wurden CD 45, CD 8, CD 68, CD 20, CD 138, MUM 1 (myelom-assoziiertes Onkogen 1) positive Zellen angefärbt sowie C5b-9, MHC-Klasse-I, MHC-Klasse-II, developmental Myosin (devMHC), neonatal Myosin (neoMHC).

Um bei Raumtemperatur zu adaptieren wurden vor den jeweiligen histologischen Färbungen die Objektträger mit den Muskelschnitten für 20 Minuten aus den -20° Kühlern entnommen, um im Anschluss 10 Minuten in Aceton fixiert zu werden. Alle o.g. histochemischen Färbungen erfolgten nach Standardprotokollen (Romeis).¹⁰⁵ Zur

Entwässerung wurde am Ende der Einzelfärbungen eine aufsteigende Alkoholreihe eingesetzt (20 Sekunden in 70%, je 1 Minute in 80%, 96% und 100% Alkohol) durchgeführt. Im Anschluss wurde mit Xylol geklärt (zweimal für je 2-3 Minuten) und die Schnitte mit einem Einschlussmedium (ROTI-HISTOKIT II) eingebettet.

Tabelle 9 soll einen Überblick über die Interpretation der Färbungen geben.

Tabelle 9: Kurzinterpretation der Färbungen

Färbungen	Kurzinterpretation
H&E, Gö	Atrophie, Nekrose, zytoplasmatische Strukturanomalien, entzündliche Infiltrate
SDH & COX-SDH	COX negative Fasern, COX Blässe perifaszikulär
unspezifische Esterase, CD56, developmental Myosin, neonatal Myosin	Regeneration
alkalische Phosphatase, EvG	Fragmentierung und Fibrosierung
saure-Phosphatase- unspezifische-Esterase- und CD-68-Färbung	Myophagozytosen
CD 8, -20, -45, positive Zellen	Leukozytäre Infiltrate
CD 138, MUM 1	Plasmazellen (Oberflächenmarkierung und Kernmarkierung)
MHC-Klasse-I	Sarkolemmale Färbung, Verteilung der sarkolemmalen Färbung in den Fasziklen (Gradient), Makrophagen, Gefäße
MHC-Klasse-II	Verlust oder partieller Verlust von Kapillaren, Erweiterung der Gefäße, Makrophagen, perifaszikuläre MHC Klasse II Färbung auf dem Sarkolemm (Gradient)
C5b-9	Aktivierung des Komplementsystems auf Kapillaren und/oder auf dem Sarkolemm perifaszikulär gelegener Muskelfasern

3.2.2 Immunhistochemische Färbungen

Diese Methode kann unter Verwendung einer farblich dargestellten Antigen-Antikörper-Reaktion zur Sichtbarmachung von verschiedenen Zellarten und Zellbestandteilen und deren Distribution innerhalb eines Gewebes genutzt werden. Als Antigen dienen dabei unterschiedliche Zellbestandteile (Proteine) wie z.B. Oberflächenrezeptoren oder Intermediärfilamente wie Vimetin oder Aktin. Die Antikörper sind Enzym- oder Fluorchrom gekoppelt, so markieren sie nach der Bindung an das entsprechende Antigen dieses farbig. Ist der Antikörper Enzymgekoppelt löst die Enzym-Substrat-Reaktion die Farbenentstehung aus.

Nach der in 3.2.1 beschriebener Vorbehandlung wurden die Gewebsschnitte, um unspezifische Bindungen zu vermeiden mit passendem Serum blockiert. Dieses entsprach dabei jeweils der Spezies des sekundären Antikörpers. Die Objektträger wurden dabei und im Folgenden in einer feuchten Kammer platziert. Dort wurden sie über Nacht bei 4°C oder 2 Stunden bei Raumtemperatur mit den primären Antikörpern (**Tabelle 4**) und am nächsten Morgen mit den Enzymgekoppelten (**Tabelle**

5) sekundären Antikörpern für weitere 1,5 Stunden inkubiert. Nach jeder Inkubation folgte ein Waschschrift mit PBS für 10min. Bei allen Durchläufen wurde eine Negativ-Kontrolle, die nicht mit dem primären Antikörper inkubiert wurde, mitdurchgeführt. Im Anschluss wurde die Enzym-Substrat-Reaktion mit dem DAB-Chromogen (braune Farbe) entwickelt. Dabei wurde nach Herstellerempfehlung unter Lichtabschluss eine Entwicklungszeit von 1 bis 10min eingehalten. Beendet wurde die Reaktion mit destilliertem Wasser. Um im Kontrast die Anfärbung der Zellkerne darzustellen, folgte eine 2-3 sekundige Gegenfärbung mit Hämalaun und die anschließende Spülung mit lauwarmem Leitungswasser für 5 Minuten. Die Entwässerung und Einbettung erfolgten wie in 3.2.1 beschrieben.

3.2.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Mehrfachimmunfluoreszenztechnik ist eine Methode, die es ermöglicht, Kollokalisierungen unterschiedlicher Antigenstrukturen und ihre räumliche Verteilung im Gewebe zeitgleich per Fluoreszenz ausschließlich der gefärbten Strukturen sichtbar zu machen. Dabei markieren sekundäre Fluorchrom-markierte Antikörper die Antigenstrukturen. Weil diese lichtsensibel sind, fanden ab der Applikation der sekundären Antikörper alle weiteren Schritte im Protokoll unter Lichtabschluss statt. Das verwendete Protokoll zur Immunfluoreszenz Doppelfärbung entspricht bis zur Inkubation mit den sekundären Antikörpern den im Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Schritten der immunhistochemischen Einzelfärbung. Es wurden die primären Antikörper aus **Tabelle 4** genutzt. In allen Färbungen wurde für jeden der beiden primären Antikörper ein sekundärer Antikörper, also pro Färbung zwei sekundäre Antikörper verwendet. Diese unterschieden sich in ihrem Emissionsspektrum um die jeweiligen Strukturen an die, die beiden ersten Antikörper banden farblich differenziert darzustellen. Es kamen AF647 (far red), AF488 (in allen Abbildungen grün dargestellt) und Cy3 (in allen Abbildungen rot dargestellt) zu Anwendung (**Tabelle 5**).

Nach Inkubation mit einem ersten fluoreszierenden sekundären Antikörper wird das Protokoll mit einem zweiten primären Antikörper, der an ein anderes Zielantigen bindet und einem zweiten Fluorchrom-gekoppelten sekundären Antikörper der bei entsprechender Anregung Licht anderer Wellenlänge emittiert auf denselben Gewebsschnitten wiederholt. Im Anschluss wurden die Färbungen wässrig eingebettet (VECTASHIELD Mounting Medium mit DAPI; blau, Zellkerne) und bei 4°C bis zum Mikroskopieren aufbewahrt.

3.2.4 Histologische Auswertung

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der immunhistochemischen Färbungen wurden am Olympus BX50 Mikroskop durchgeführt, und Photographien charakteristischer Befunde mit der cell^D Software (Olympus, Tokio, Japan) aufgenommen.

Für die Bewertung des Schweregrades der Muskelschädigung in den verschiedenen Kategorien wurden die histologischen Färbungen zunächst in einem eigens entwickelten 'overall severity score' bewertet.

Der sog. 'overall severity score' von 1-10 wurde wie folgt definiert: score 1: sehr gering betroffen; score 10: sehr stark betroffen

Dabei wurden Anzeichen von Atrophie, Nekrose, Fibrose, Fragmentierung des Bindegewebes, Regeneration, vaskulärer Beteiligung und Inflammation im gesamten für jede Skelettmuskelbiopsie der Patienten bewertet.

Tabelle 10: Scores und Punktwerte der histologischen Merkmale

Merkmale	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Atrophie, Nekrose, Regeneration, MHC-I-Expression, Komplementaktivierung	keine	gering	mittel	stark
Perifaszikuläre Fragmentierung	keine	gelegentlich perimysial	deutliche perimysial	peri-/ endomysial
Perifaszikuläre Fibrosierung	nein	ja		
Kapilläre Erweiterung	nein	ja		
Kapilläres Fehlen	keine	vereinzelt	gehäuft, aber perifaszikulär beschränkt	In ganzen Arealen, flächigen Anteilen von Faszikeln
Makrophagenanfärbung	keine	Leicht perivaskulär und perimysial	Deutlich perivaskulär, peri-/endomysial	Stark perivaskulär, peri- und endomysial
Zelluläre Inflammation durch B-, T-, Plasmazellen und Makrophagen pro Gesichtsfeld	keine	1-4 Zellen	4-20 Zellen	Cluster von mehr als 20 Zellen
Die MHC-I- und MHC-II Anfärbungen im perifaszikulären Bereich	keine	Vereinzelte Fasern	perifaszikulär (ca. 1-2 Schichten)	Flächig in Teilen ganzer Faszikel (deutlich über 2 Schichten)

Die pathologischen Zeichen wurden anschließend im Einzelnen mit einem score zwischen 0-3 bewertet (siehe **Tabelle 10**). Für eine detailliertere Veranschaulichung wurde zum Teil nach 0,5er Schritten bewertet. Dieser score und typische histomorphologische Ausprägungen bei ASyS sind in **Abbildung 6** veranschaulicht.

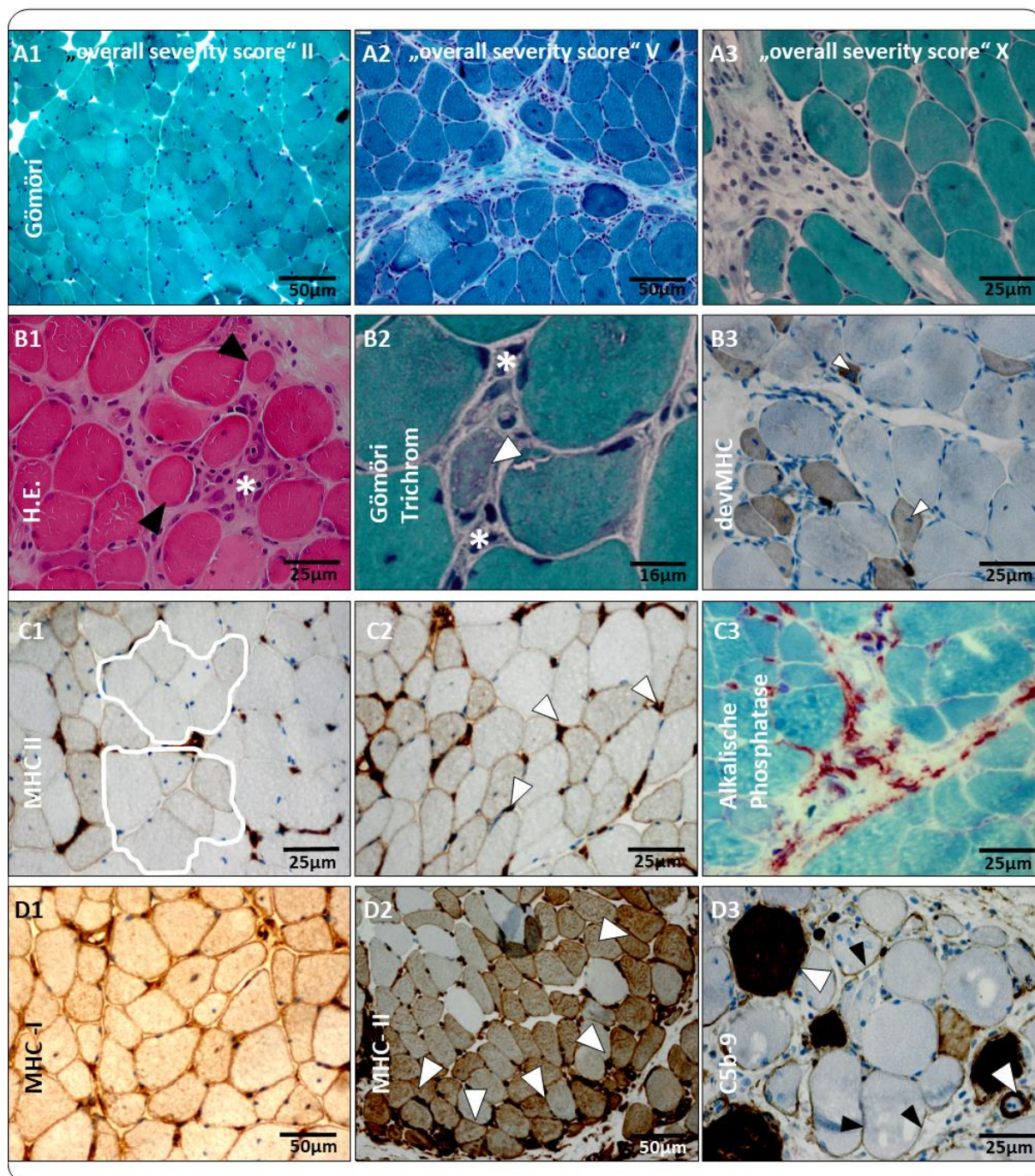


Abbildung 6: Scores und histologische Merkmale

(A) zeigt beispielhaft drei verschiedene Schweregrade im „overall severity score“ (1-10 Punkte). Die Muskulatur in (A1) ist mit 2 Punkten nur leicht, in (A2) mit 5 Punkten mittelstark und in (A3) mit der maximalen Punktzahl von 10, stark betroffen.

In H.E. sieht man in (B1) eine in aufgelockertes und vermehrtes Bindegewebe (weißer Stern) eingebettete, durch abgerundete atrophe Fasern unterschiedlicher Kalibergröße (schwarze Pfeilspitzen) charakterisierte, schwere Myopathie (Verhältnis größte zur kleinsten Faser > 2:1). In der Gömöri Trichromfärbung stellt (B2) eine Muskelfasernekrose (weiße Pfeilspitze) mit verminderter Zellgröße und scholligem Zytoplasma dar. Weiße Sterne markieren Leukozyteninfiltrate. (B3) zeigt in der devMHC-Färbung bräunliche regenerative Fasern verminderter Größe, mit zentralisierten blasigen Kernen (schwarze Pfeilspitzen).

Gefäßpathologie bei ASyS sind in (C1/2) durch die MHC-II-Färbung dargestellt. Im Querschnitt des gesunden Muskels sieht man pro Zelle 2-5 begleitende Kapillaren, diese fehlen in (C1) in ganzen Arealen (weiße Umrandungen). (C2) zeigt erweiterte Kapillaren (weiße Pfeilspitzen). Die Bindegewebspathologie (Fragmentierung) ist in (C3) durch eine kräftige perifaszikuläre Reaktion mit alkalischer Phosphatase (rot) veranschaulicht.

(D1) zeigt eine diffuse sarkolemmale MHC-I-Hochregulation, dezent perifaszikulär betont, während die MHC-II-Hochregulation in (D2) stark perifaszikulär (weiße Pfeilspitzen) akzentuiert auftritt. (D3) C5b-9 tritt physiologisch auf Gefäßen und unspezifisch auf nekrotisierenden Fasern (weiße Pfeilspitzen) auf. Komplementaktivierung bei ASyS ist verstärkt, was sich durch eine deutliche Anfärbung auf dem Sarkolemma perifaszikulär gelegener Muskelfasern (schwarze Pfeilspitzen) zeigt

3.2.5 Elektronenmikroskopie

Um die Pathologie der Aktinaggregation zu illustrieren, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen des Muskelgewebes durchgeführt. Dazu wurden die Muskelproben primär für 48 Stunden bei 4° C in 2,5 % Glutaraldehyd fixiert, in 1 % Osmium(VIII)-oxid nachfixiert und anschließend in Kunstharz eingebettet. Die aus den Kunstharzblöcken gefertigten Ultradünnschnitte wurden anschließend mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem Zeiss P902 Elektronenmikroskop hergestellt (Zeiss, Deutschland). Die Aufarbeitung wurde von speziell geschultem Personal des Instituts für Neuropathologie der Charité durchgeführt.

3.3 Analyse der Genexpression

Als Grundlage für die im Folgenden beschriebenen Methoden dienten 30x10µm dicke Biopsatschnitte die im Kryostat geschnitten und in 1.5 ml Eppendorfgefäßen gesammelt und nativ (also ohne weitere Fixierung) bei -80°C gelagert wurden.

3.3.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA wurde die Trizol/Chloroform-Methode nach Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi verwendet und nach Angaben des Herstellers gearbeitet (Invitrogen, Carlsbad CA).

Zunächst wurde das Muskelgewebe mit peqGOLD® Trifast (Pqlab) homogenisiert. Während der 5-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur kommt es in diesem Schritt zu einer Zelllyse und Inaktivierung der RNasen durch Guanidinisothiocyanat, sowie zu einer Lösung von DNA und Proteinen durch Phenol.

Nach einem weiteren Inkubationsschritt mit 200µl Chloroform und anschließender Zentrifugation (12.000g bei 4°C für 10 Minuten) kommt es zur Phasentrennung. Die obere wässrige und RNA-haltige Phase wurde im Anschluss mit 0,5 µl RNase freiem Glykogen und 500µl Isopropanol zur Präzipitation in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach 10-minütiger Inkubation und Zentrifugation (12.000g bei 4°C für 10 Minuten) und Entfernung des Überstands wurde das so entstandene gelartige RNA-Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand erneut

entfernt. Das RNA-Pellet trocknete dann 30min bei Raumtemperatur. Durch Inkubation in 30µl RNase freiem Wasser bei 56°C wurde die RNA resuspendiert und bei -80°C weggefroren. Zur Überprüfung des Reinheitsgrades (A260/280-Quotienten von 1.6-2.1) sowie der Bestimmung der Konzentration der RNA wurde der Infinite M200 Microplate Reader mit der entsprechenden Software (i-control Tecan, Männedorf, Schweiz) genutzt.

3.3.2 RNA-Isolierung der nukleären und zytoplasmatischen Fraktion

In dieser Methode wurde die nukleäre und zytoplasmatische RNA getrennt voneinander isoliert um im Weiteren die nukleäre und zytoplasmatische Genexpression der am Aktinshutteling beteiligten Moleküle gesondert zu untersuchen. Die Isolation erfolgte mit dem SurePrep™ Nuclear or Cytoplasmic RNA Purification Kit (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten). Im ersten Schritt wurde das Muskelgewebe mit dem sog. VWR® Disposable Pellet Mixer and Cordless Motor (VWR International, Randon, PA, USA), mechanisch zerkleinert, dies fand auf Trockeneis statt um ein Auftauen des Gewebes zu verhindern. Zur Homogenisierung wurde das Gewebe mit 200µl Lyselösung (10µl β-Mercaptoethanol/1ml Lysis Solution des Purification Kits) bei 4°C inkubiert, bis sich das Gewebe sichtbar aufgelöst hatte. Danach wurde es in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Phasentrennung für 3 Minuten zentrifugiert (14.000g, bei 4°C).

Im Überstand, der in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt wurde befand sich nun der zytoplasmatische Anteil, während im Ausgangsgefäß das Pellet, mit dem nukleären RNA Anteil zurück blieb, ab jetzt konnten die Fraktionen getrennt weiterbehandelt werden.

Nach Inkubation der zytoplasmatische Fraktion mit 200µl und der nukleären mit 400µl Bindungslösung (10µl β-Mercaptoethanol/1ml Binding Solution des RNA Purification Kits) wurde zur Durchmischung 10 Sekunden gevortext. Beide Fraktionen wurden mit 200µl 100% Ethanol inkubiert und erneut 10 Sekunden gevortext und zur Abscherung der genomischen RNA 5-10 mal durch eine 25G Kanüle gespritzt. Es folgte die Überführung in Filtergefäße (Bestandteil des SurePrep™ Nuclear or Cytoplasmic RNA Purification Kits), an deren harzbeschichteten Säulen die RNA nun mithilfe der Bindungslösung und durch Zentrifugation (1 Minute bei 4°C, 14.000g) anhaftete.

Das Filtrat wurde in einem Gefäß gesammelt und entsorgt. Anschließend folgten 3 Waschschrte mit 400µl Waschlösung (Bestandteil des SurePrep™ Nuclear or Cytoplasmic RNA Purification Kits). Zwischen den Waschschrten wurde zweimal 1

Minute und einmal 2 Minuten bei 14.000g zentrifugiert und das Filtrat anschließend entsorgt.

Die Elution erfolgte durch einlegen der Filtergefäße in ein sauberes Sammelgefäß. Nach der Inkubation in 50µl Elutionslösung (Bestandteil des SurePrep™ Nuclear or Cytoplasmic RNA Purification Kits) folgte die Zentrifugation (2 Minuten bei 200g und 1 Minute bei 14.000g) zur Ablösung der RNA von den Harzsäulen.

Reinheitsgrad und Konzentration der RNA wurden wie in Abschnitt 3.3.1 mit dem Infinite M200 Microplate Reader bestimmt und die RNA anschließend bei -80°C weggefroren.

3.3.3 cDNA Synthese

Um die isolierte RNA für die qPCR nutzen zu können wurde die RNA zunächst mittels der reversen Transkriptase enzymatisch in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Zunächst wurde das DNase free Kit (siehe **Tabelle 7**) verwendet, um kontaminierte DNA und DNasen aus den RNA-Proben zu entfernen. Dazu inkubierten sie bei 37°C für 30 Minuten in einem nach Herstellerangaben erzeugten Gemisch aus rDNase, DNase Puffer und RNase freiem Wasser unter Verwendung von 2,2µg RNA pro Probe.

2,2 µg RNA + 5 µl DNase-Buffer (10x) + 1 µl rDNase + x µl H₂O (Gesamtvolumen 50µl)

Um die rDNase-Reaktion zu stoppen wurde nach 30 Minuten eine im Kit enthaltene Inaktivierungsreagenz verwendet (2 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur) und anschließend bei 10.000g für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Herstellung der cDNA wurde das High-Capacity cDNA Archive Kit (siehe **Tabelle 7**) verwendet und nach Angabe des Herstellers dem oben genannten Überstand (~50µl) weitere 50µl eines Mastermix s.u. hinzugefügt.

Mastermix bestehend aus:

10 µl 10x RT Puffer, 10µl 10x RT Random Primer, 4 µl 25x dNTP Mix, 5 µl Reverse Transkriptase und 21 µl RNase-freiem Wasser.

Nach der Umschreibung wurde die cDNA bei -20°C aufbewahrt.

Im Cycler (**Tabelle 8**) erfolgte daraufhin die Umschreibung in cDNA in folgenden Schritten:

1. 25°C 10 Minuten
2. 37°C 2 Stunden
3. 85°C 5 Sekunden
4. 4°C Hold

3.3.4 Quantitative Real Time Polymerase Ketten Reaktion (qPCR)

Die Methode der quantifizierten Echtzeit PCR wurde im nächsten Schritt genutzt, um die cDNA zu amplifizieren und gleichzeitig zu quantifizieren, sie beruht auf dem Prinzip der konventionellen PCR. In dem Verfahren wurde das Expressionsniveau verschiedener Gentranskripte (**Tabelle 6**) und eines endogenen Kontrollgens, (Phosphoglyceratkinase 1, PGK1, **Tabelle 6**) analysiert. Dazu wurde das 5'-Nuklease Verfahren auf einem ABI PRISM® 7900HT Fast Real-Time PCR System und ein TaqMan® Gene Expression Assay für menschliche DNA (beides Applied Biosystems, USA) verwendet. Gemessen wurde das Fluoreszenz-Signal der Reportersonden in der exponentiellen Amplifikationsphase jedes PCR-Zyklus und dieses wurde zur Quantifizierung benutzt.

Das Expressionsniveau der endogenen Kontrolle *PGK1* war in allen untersuchten Proben annähernd gleich hoch und damit nicht vom Verlauf der verschiedenen Erkrankungen beeinflusst.

Als Ausgang für die qPCR wurden je 20ng cDNA der TaqMan FastStart Universal PCR Master Mix, der TaqMan Gene Expression Assay und Nuklease-freies Wasser (**Tabelle 7**) zugefügt, sodass jeweils ein Endvolumen von 20µl entstand.

Die Durchführung entsprach den folgenden Reaktionsbedingungen:

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen der qPCR

Temperaturen	Dauer	Anzahl der Zyklen	Reaktionen
95°	20s	1	Initiale Denaturierung
95°	1s	45	Denaturierung
60°	20s	45	Primerhybridisierung und Elongation

3.3.5 Analyse und Auswertung

Die Bestimmung jedes Wertes (des Genexpressionslevels) (**Tabelle 6**) für jede Patienten DNA erfolgte dreifach. Dabei waren die Grundeinstellungen der Reaktion (**Tabelle 11**) ebenso wie der Ct Wert (cycle of treshold-Wert) vorgegeben. Der Ct-Wert ist die Zyklusanzahl, bei der das gemessene Fluoreszenzsignal zum ersten Mal die zuvor gemessene Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Bei Amplifikation der DNA-Menge in jedem Zyklus wird dieser Schwellenwerte desto schneller erreicht, je mehr DNA zu Beginn in der Reaktion in der Probe vorhanden war. Das heißt, der Ct Wert ist umgekehrt proportional zur Menge der Ausgangs-DNA. Um eine relative Quantifizierung darzustellen wurde mit dem ΔCT (= Ct – Ct der endogenen Kontrolle) ein Bezug der Zielantigene betroffener Patienten zu der in Abschnitt 4 beschriebenen

immer gleichmäßig exprimierten endogenen Kontrolle hergestellt und in Relation zu dem Genexpressionsniveau nicht betroffener Patienten der Gruppe der Normalkontrollen (Kalibrator) ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ normal control}$) gesetzt. Die relative Differenz des Genexpressionsniveaus (RQ-Wert) zwischen der DNA betroffener Patienten und dem Kalibrator, ergab sich aus den $\Delta\Delta Ct$ -Werten und der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Berechnet wurde dies mit der software SDS 2.4. und dem Relative Quantification (RQ) Manager 1.2.1.

3.4 Statistische Auswertung

Mit dem Programm GraphPad Prism 5.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) konnten die RQ-Werte der Patientengruppen statistisch verglichen und anschließend graphisch dargestellt werden. Dazu diente der parameterfreie H-Test nach Kruskal und Wallis mit anschließender Dunn Korrektur. Die Darstellungen zeigen den Mittelwert \pm SEM und die p-Werte, die unterhalb des Signifikanzniveaus lagen. Dieses wurde auf 5 % (*), 1 % (**) bzw. 0,1 % (***) festgesetzt und in den Graphiken so gekennzeichnet. Der Mittelwert \pm SEM ist in den Graphiken als Strich parallel zur y-Achse gekennzeichnet. RQ-Werte wurden logarithmisch und ΔCt -Werte auf inverser Achse veranschaulicht.

4 ERGEBNISSE

4.1 Zusammenfassung der klinischen Daten im Vergleich

In **Tabelle 12** sind die klinischen, laborchemischen und epidemiologischen Charakteristika von 39 Patienten mit ASyS im Vergleich zu 8 Normalkontrollen/non disease controls (NDC) dargestellt. Einschlusskriterium für die jeweiligen Gruppen war der positive Antikörpernachweis eines der drei ARS Anti-PL-7, -PL-12 oder -Jo1 (siehe 3.1.1). Die Altersspanne aller Betroffenen reichte von 23–78 Jahren. Im Mittel waren Anti-PL-7⁺ Patienten (n=10) und Anti-Jo1⁺ Patienten (n=16) 58 Jahre, Anti-PL-12⁺ Patienten (n=13) 55 Jahre. Das durchschnittliche Alter der NDC lag bei 32 Jahren. Die Geschlechterverteilung der Anti-PL-7⁺ Patienten zeigte sich ausgeglichen (50:50), während in den Kohorten Anti-PL-12⁺ und Anti-Jo1⁺ Getesteter die Anzahl der Frauen durchschnittlich etwas höher lag (PL-12: 61,5%, Jo1: 68,7%).

75% aller Patienten hatten bereits längere Zeit vor dem Datum der Muskelbiopsieentnahme Beschwerden. Bei allen drei Gruppen waren sie jedoch häufig <1 Jahr bestehend. Sowohl in der PL-7- als auch der Jo1-Kohorte gab es zwei Patienten, die schon >1 Jahre jedoch <5 Jahren symptomatisch waren. Ein Patient (Anti-PL-7⁺) starb sieben Wochen nach Therapiebeginn mit Rituximab. Sonst sind keine weiteren Todesfälle bekannt.

Es gab in jeder der drei Gruppen Patienten, die keine subjektive Muskelsymptomatik zeigten. Der Anteil dieser Patienten war mit 40% in der PL-7-Fraktion am größten, in 30% dieser Fälle waren die CK-Werte allerdings oberhalb der Norm. In der Jo1-Gruppe waren mit 88% die meisten Patienten muskulär beeinträchtigt. Mit einem Anteil von 19% war in der Jo1-Kohorte am häufigsten ausschließlich die Muskulatur betroffen, neben 10% in der PL-7- und 8% in der PL-12-Gruppe. Dazu passend waren bei Anti-Jo1⁺ Patienten gehäuft CK-Wert-Erhöhen um das ~20-fache (>3.000 U/l) der Norm (180 U/l) gemessen worden, während der Wert in den beiden anderen Gruppen vorwiegend im Bereich 1-facher bis 10-facher Erhöhung lag (Mittelwert aller Patienten 4.600 U/l). Auch war der Anteil >20-facher CRP-Werterhöhung (>10mg/dl) in der Jo1-Gruppe ca. doppelt so hoch wie in den beiden anderen Gruppen.

Eine Häufung isoliert auftretender Lungenbeteiligung bei Anti-PL-12⁺- und Anti-PL-7⁺ Patienten konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden und war mit nur 8% unter allen ASyS-Patienten (je ein Patient pro Gruppe) selten. Insgesamt war eine Beteiligung der Atemorgane bei den Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten mit jeweils ~50% häufiger als bei Anti-Jo1⁺ Patienten (31%). In Kombination mit muskulären

Beschwerden trat die ILD bei 46% der Anti-PL-12⁺-Patienten, gefolgt von 40% der Anti-PL-7⁺ Patienten und bei 25% der Anti-Jo1⁺ Patienten auf. Muskuläre Symptome in Kombination mit anderen extramuskulären Symptomen (Haut-, Gelenk-, Herzbeteiligung, Gewichtsverlust, Müdigkeit, Fieber, Raynaud-Syndrom) traten bei Anti-Jo1⁺ Patienten in 44%, bei Anti-PL-12⁺ Patienten in 46% und bei Anti-PL-7⁺ Patienten in 40% der Fälle auf. Bei Anti-Jo1⁺ Patienten war eine Beteiligung der Gelenke häufig, mit 50% im Vergleich zu jeweils 30% in den anderen beiden Gruppen. Neoplasien kamen bei zwei Patienten der PL-12-Kohorte vor, in beiden Fällen lag das Ereignis >10 Jahre in der Vergangenheit und kann daher nicht mit ASyS in Zusammenhang gebracht werden. Entzündliche Herzbeteiligung konnte insgesamt bei 18% festgestellt werden, bei einem Patienten der PL-7-Gruppe und jeweils drei Patienten der anderen beiden Gruppen. Hautbeteiligung, Gewichtsverlust, Müdigkeit, Fieber, Schluckstörung oder das Raynaud-Syndrom waren in den drei Gruppen etwa gleich häufig (~13%). Entzündungen der Haut die sogenannten Mechaniker Hände, die mit Rhagaden und Fissuren der radialeseitigen Finger und Handinnenflächen verbunden sind und auch an den Füßen vorkommen können wurden bei ca. 20% der Erkrankten gesehen mit einer Prädominanz in der Jo1-Kohorte. Davon zu unterscheiden sind die klassischen Hauterscheinungen bei Dermatomyositis (Gottron's Papeln, livides Erythem, Ödeme der Lider, V-sign, shawl-sign) die eines der Diagnosekriterien für DM sind. In allen drei Patientengruppen waren Dermatomyositis-typische Hautphänomene ein seltenes Ereignis. In der PL-7- (20%) und PL-12-Gruppe (23%) waren sie etwas häufiger als in der Jo1-Gruppe (13%). Der Nachweis ASyS-unabhängiger MSA wie SS-A/Ro52 oder PM-Scl100 korrelierte weder mit dem Auftreten spezifischer ARS noch mit einem schwereren Krankheitsverlauf oder höheren CK-Werten. Aufgrund der Streuung bei stark verminderter Fallzahl (siehe 3.1.2), konnte in der statistischen Erhebung leider keine Signifikanz erreicht werden. Therapeutisch wurde am häufigsten mit Glukokortikoiden gearbeitet. Der Einsatz einer zusätzlichen Therapie mit DMARDs war in der PL-7-Gruppe (50%) höher als in der PL-12- (23%) oder in der Jo1-Gruppe (37%). Benutzt wurden hier häufig Methotrexat, Cyclophosphamid, Azathioprin aber auch Rituximab und Mycophenolat-Mofetil. In vier Fällen wurde bei Patienten eine intravenöse Immunglobulintherapie durchgeführt.

Alle klinischen Daten sind auch in **Tabelle 12** noch einmal zusammengefasst:

Tabelle 12: Klinische Daten

Aufgelistet sind allgemeine klinische Daten wie Geschlecht und Alter, laborchemische Befunde wie der Nachweis von Antikörpern, CK-Werterhöhung und CRP-Werterhöhung. Des Weiteren wird der zeitliche Bezug zwischen Auftreten von Symptomen und Biopsieentnahme und verschiedene mit ASyS assoziierte Symptome an sich dargestellt. Zudem wird die prozentuale Häufung innerhalb der Gruppen aufgezeigt. Wichtig ist anzumerken, dass die Symptome in der NDC-Gruppe rein subjektiver Genese sind und nach erfolgter Biopsie ohne pathologischen Hintergrund zu werten sind.

		PL-7 (n=10)	PL-12 (n=13)	Jo1 (n=16)	NDC (n=8)
Mittleres Alter bei Biopsie		58	55	58	32
Geschlecht	♀	50% (5)	62% (8)	69% (11)	37% (3)
	♂	50% (5)	38% (5)	31% (5)	63% (5)
Weitere Antikörper Vorhanden?		40% (4)	38% (5)	25% (4)	-
CK in U/l	Normal	10% (1)	8% (1)	-	50% (4)
	<10fach erhöht	60% (6)	46% (6)	19% (3)	-
	>10fach erhöht	20% (2)	8% (1)	6% (1)	-
	>30fach erhöht	10% (1)	31% (4)	44% (7)	-
	Unbekannt	-	8% (1)	31% (5)	50% (4)
CRP in mg/dl	<10fach erhöht	60% (6)	62% (8)	50% (8)	100% (8)
	>10fach erhöht	-	23% (3)	-	-
	>20fach erhöht	20% (2)	15% (2)	37% (6)	-
	Unbekannt	20% (2)	-	33% (2)	-
Symptombeginn vor Biopsie	<1 Jahr	60% (6)	77% (10)	46% (9)	26% (2)
	>1 Jahr	20% (2)	-	-	-
	>5Jahr	-	-	33% (2)	37% (3)
	Unbekannt	20% (2)	23% (3)	31% (5)	37% (3)
Symptome	Muskelsymptome	60% (6)	84% (11)	88% (14)	88% (7)
	Schmerz	60% (6)	77% (10)	75% (12)	75% (6)
	Schwäche	50% (5)	62% (8)	46% (9)	37% (3)
	ILD	50% (5)	54% (7)	31% (5)	-
	Hautbeteiligung	20% (2)	39% (5)	50% (8)	-
	MH*	20% (2)	23% (3)	13% (2)	-
	DM-Symptome**	20% (2)	23% (3)	13% (2)	-
	Raynaud	20% (2)	15% (2)	25% (4)	-
	Herzbeteiligung	10% (1)	23% (3)	19% (3)	-
	Arthritis	30% (3)	30% (4)	50% (8)	-
	Fieber	30% (3)	39% (5)	6% (1)	-
	Dysphagie	10% (1)	8% (1)	6% (1)	-
	Gewichtsverlust	10% (1)	31% (4)	12% (2)	-
Neoplasie	-	15% (2)	-	-	
Therapie	Cortisol	50% (5)	62% (8)	46% (9)	-
	DMARDs	50% (5)	23% (3)	37% (6)	-
* Mechaniker Hände					
** Gottron´s Papeln, livides Erythem, Ödeme der Lider, V-sign, shawl-sign					

4.2 Histologische Charakteristik der Autoantikörpergruppen

4.2.1 Grundsätzliche Myopathologie bei ASyS

Von insgesamt 33 Skelettmuskelbiopsien der ASyS-Patienten wurden konventionell histologische und immunhistochemische Färbungen angefertigt. Davon wurden 9 Patienten positiv auf Anti-PL-7-, 13 positiv auf Anti-PL-12- und 11 positiv auf Anti-Jo1-Autoantikörper getestet.

Histomorphologische und ultrastrukturelle Untersuchungen der Skelettmuskulatur ergaben in allen drei Gruppen bezüglich folgender Merkmale ein einheitliches Bild: Betont auf perifaszikuläre Bereiche und Regionen nahe dem Perimysium sieht man in der H&E- und Gömöri-Trichrom-Färbung atrophe, neben normal großen und hypertrophen und im Querschnitt abgerundete Muskelfasern mit teilweise internalisierten Zellkernen (**Abbildung 7 A1-B3**). Diese Areale sind zusätzlich durchzogen von teils nekrotischen Fasern (**Abbildung 7 A2-3, B1-3 und Abbildung 6 B2**). In dieser Lokalisation befinden sich einige Fasern in Regeneration, in **Abbildung 7 A-C und Abbildung 8 D** illustriert z.B. durch die CD56 Färbung. In der Gömöri-Trichrom-Färbung und der alkalischen Phosphatase-Reaktion (**Abbildung 7 A1-3, C1-3**) erscheint das interstitielle Bindegewebe des Peri- und Endomysiums aufgelockert und stark fragmentiert. In der Elastika-van-Gieson-Färbung sieht man ein verbreitertes, ödematös fibrosiertes Perimysium (**Abbildung 7 D**). COX-defiziente oder schwach angefärbte Fasern sind in keinem Präparat der AsyS-Patienten zu sehen (**Abbildung 7 E**). Es gibt keinen Nachweis von sog. "punched-out" Vakuolen. Die Verteilung und die Quantifizierung regenerativer Fasern wurde zusätzlich untersucht (**Abbildung 8 E, F**). Hierzu wurden Antikörperfärbungen gegen „developmental“ und „neonatal“ Myosin heavy chain (dev/neoMHC-Färbung), entsprechend der embryonalen und fetalen Isoform der schweren Kette des Myosins verwendet.

Perivaskulär sowie peri- und endomysial infiltrieren Makrophagen, T- und B-Lymphozyten sowie Plasmazellen das Gewebe. Kapillaren zwischen den Muskelfasern sind teils erweitert oder fehlen vereinzelt oder in größeren Arealen. Zytoplasmatische Strukturanomalien wie Target- oder targetoid-Fasern, geränderte Vakuolen oder ragged red/blue Fasern sind nicht zu finden. Immunhistochemisch ist mit der C5b-9-Antikörper-Färbung in perivaskulären und in perifaszikulären Muskelfasern sarkolemmal Komplementaktivierung sichtbar gemacht (siehe **Abbildung 8 C1-3 und Abbildung 6 D3**). Diese ist teils besonders kräftig in der Umgebung nekrotischer Fasern erkennbar. Komplement (C5b-9) auf Kapillaren konnte in keinem Fall beobachtet werden. HLA-ABC- und HLA-DR-positive Myozyten sind betont in perifaszikulären Regionen, aber auch flächig den ganzen Faszikel betreffend (insb. HLA-ABC) anfärbbar (siehe **Abbildung 8 A1-3, B1-3 und Abbildung 6 D1-2**).

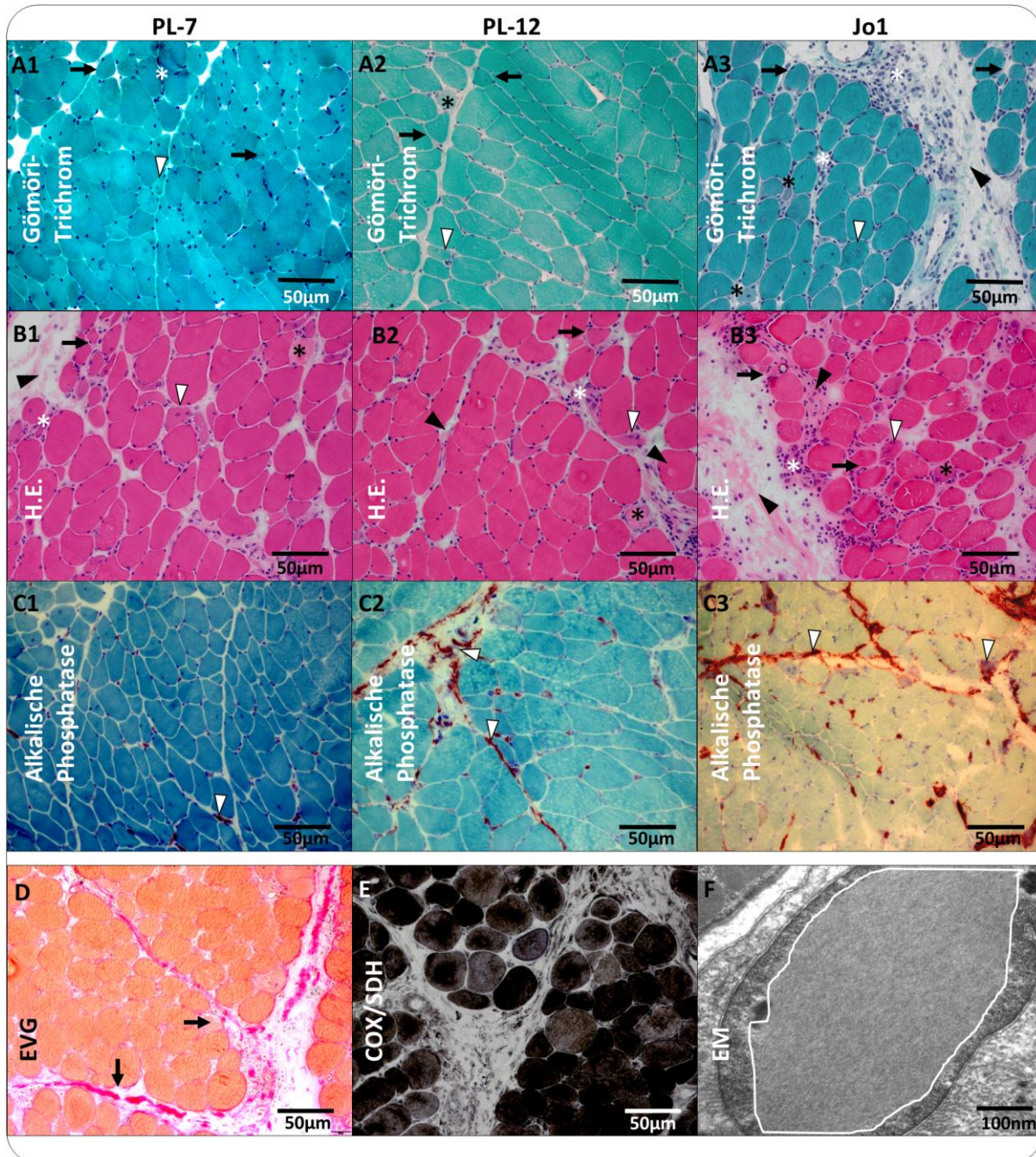


Abbildung 7: Histologische Färbungen des Muskelgewebes bei ASyS

In (A-C) sieht man Biopsien der Patientengruppen PL-7 (A1, B1, C1), PL-12 (A2, B2, C2) und Jo1 (A3, B3, C3) in unterschiedlichen histologischen Färbungen. Atrophie abgerundete Muskelzellen mit variierendem Faserkaliber (schwarze Pfeile) sind in Gömöri-Trichrom- (A1-3) und H.E.-Färbung (B1-3) dargestellt. Regenerierende Fasern geringerer Größe, mit teils basophilem Zytoplasma, internalisierten Kernen und sichtbaren Nukleoli (weiße Pfeilspitze) sind in Reihe A und B neben nekrotisierenden Zellen verminderter Größe mit teils schelligem Zytoplasma (schwarzer Stern) und Leukozyteninfiltraten (weißer Stern) zu sehen. Fragmentiertes Bindegewebe ist in Reihe (A, B) mit schwarzen Pfeilspitzen markiert und erscheint in Reihe (C) durch die alkalischen Phosphatase Reaktion in Rot (weiße Pfeilspitzen). In Abbildung (D) sieht man mit schwarzen Pfeilen markierte fibrotische Areale gefärbt mit Elastika-van-Gieson. COX-defiziente Fasern fehlen in allen Patientengruppen, in (E) exemplarisch dargestellt (Jo1⁺). (F) stellt in der Elektronenmikroskopie die für ASyS typischen nukleären Aktineinschlüsse (weiße Umrandung) dar.

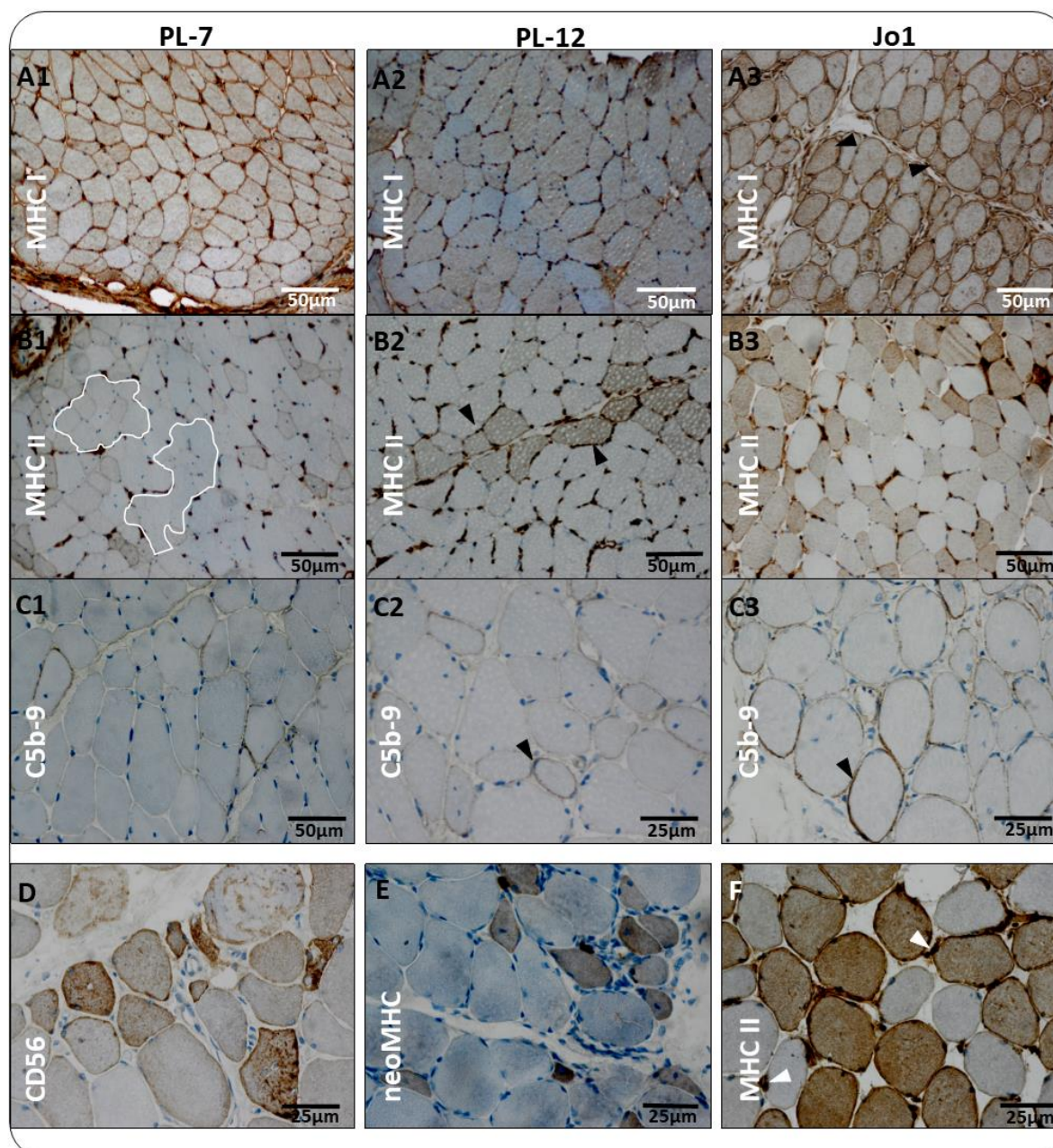


Abbildung 8: Immunhistochemisch gefärbtes Muskelgewebe

In (A-C) sieht man immunhistochemische Färbungen der Patientengruppen PL-7 (A1, B1, C1), PL-12 (A2, B2, C2) und Jo1 (A3, B3, C3) unterschiedlichen Schweregrades. Die MHC-I-Färbung (A 1-3) zeigt sich diffus und verschieden stark ausgeprägt, mit Akzentuierung im perifaszikulären Bereich (schwarze Pfeilspitzen): semiquantitativer Score I (A2), Score II (A1) und Score III (A3). Auch MHC-II (B1-3, F) wird perifaszikulär betont (schwarze Pfeilspitzen) in unterschiedlicher Ausprägung in den Gruppen exprimiert: semiquantitativer Score I (B2), Score II (B1) und Score III (B3). Kapilläre Verluste kommen vereinzelt (B2), gehäuft (B3) oder in flächigen Arealen (B1: weiße Begrenzungslinien) vor. Erweiterte Kapillaren sind MHC-II⁺ und mit weißen Pfeilspitzen markiert in Abbildung (F) zu sehen. Komplementaktivierung (C1-3) ist auf dem Sarkolemm ebenfalls perifaszikulär betont und in unterschiedlicher Stärke durch die C5b-9-Färbung dargestellt (schwarze Pfeilspitzen): semiquantitativer Score I (C1), Score II (C2) und Score III (C3). CD56⁺ Fasern (D) und Fasern die neonatales Myosin exprimieren (E) zeigen bräunlich gefärbte, in Regeneration befindliche Muskelzellen.

4.2.2 Autoantikörperspezifische Besonderheiten

Vergleicht man die drei Patientengruppen in den Standardfärbungen H&E und Gömöri-Trichrom zunächst im 'overall severity score', der den jeweiligen Schweregrad der für ASyS spezifischen Muskelpathologie auf einer Skala von 1–10 Punkten widerspiegelt, erkennt man, dass Anti-Jo1⁺ Patienten tendenziell stärker betroffen sind. In dieser Gruppe wurden in über 50% der 11 Biopsien Werte > 6 vergeben, während die Patienten in den beiden anderen Gruppen in über 50% einen score ≤ 5 hatten. Zudem war in der PL-12-Gruppe keiner und der PL-7-Gruppe nur ein Patient mit einem score über 7 eingeschätzt worden (siehe **Abbildung 9**). Eine statistische Signifikanz kommt aufgrund der Streuung jedoch nicht zustande.

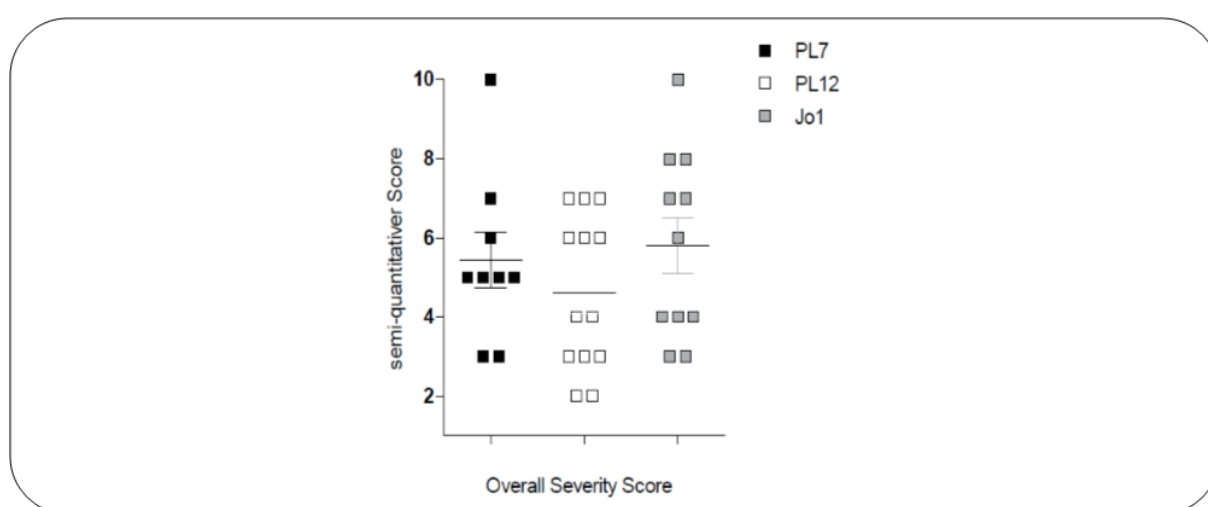


Abbildung 9: Bewertung der Myopathie bei ASyS über den sog. „Overall Severity Score“

Abgebildet sind die drei Antikörpergruppen (PL-7, PL-12, Jo1). Der allgemeine Schweregrad der Myopathie wurde semiquantitativ erhoben (1-10 Punkte, genaue Einteilung siehe Methodenteil 3.2.4). Die am stärksten betroffene Gruppe sind Anti-Jo1⁺ Patienten, die im Schnitt einen Score von 6 erreichen (Spanne 3-10). Ähnlich stark betroffen sind Anti-PL-7⁺ Patienten mit einem „OSS“ von durchschnittlich 5. Etwas weniger schwer sind PL-12⁺-Patienten, welche im Schnitt am häufigsten einen Score von 4 erreichten. Für die Auswertung des Scores mittels GraphPad Prism 5.0.2 wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließender Dunn Korrektur durchgeführt. Die Darstellung zeigt den Mittelwert ± SEM und das Signifikanzniveau wurde auf 0.05 (*) festgesetzt, welches hier nicht erreicht wurde.

Die histomorphologischen Merkmale für Atrophie, Nekrose oder Regeneration in den Muskelfasern waren bei der Jo1-Kohorte, ähnlich dem sog. 'overall severity score', stärker ausgeprägt. Vor allem Anzeichen der Regeneration und Atrophie zeigten in den Biopsien der Jo1-Fälle eine mittlere bis starke Ausprägung (**Abbildung 10**). Von Nekrose durchzogene perifaszikuläre und perimysiale Areale waren ebenfalls bei Anti-Jo1⁺ Patienten etwas häufiger. Anti-PL-12⁺ Patienten waren bildmorphologisch vor allem in Hinsicht auf Regeneration und Nekrosen oft nur gering betroffen, ohne dass sich dies durch geringere Muskelbeteiligung (insgesamt 84%) begründen ließe. Auch in den immunhistochemischen dev/neoMHC-Färbungen wird dies augenscheinlich.

Abbildung 8 E und Abbildung 6 B3, zeigen die Merkmale in verschiedenen histologischen Färbungen des Muskelgewebes. Eine statistische Signifikanz kommt aufgrund der Streuung jedoch nicht zustande.

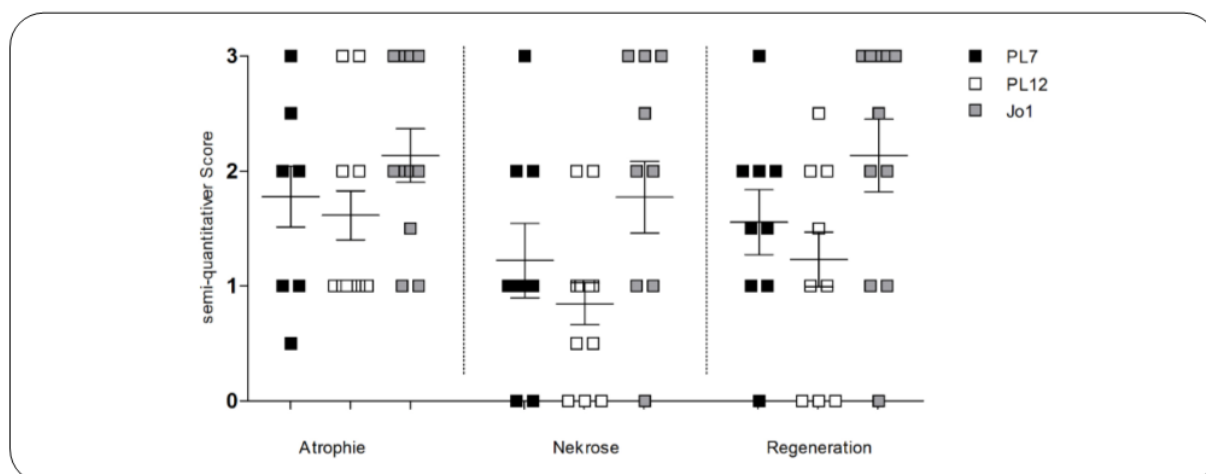


Abbildung 10: Ausprägung von Atrophie, Nekrose und Regeneration der Muskelzellen bei ASyS
 Für die Ausprägung der histomorphologischen Merkmale wurden je 0-3 Punkte vergeben. Die Jo1-Gruppe präsentierte in allen drei Attributen die höchsten Punktzahlen, während sich die beiden anderen Gruppen in der Ausprägung ähnlich waren. Die Nekrose ist bei Anti-PL-12⁺ Patienten etwas reduziert, jedoch wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Für die Auswertung der Scores mittels GraphPad Prism 5.0.2 wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließender Dunn Korrektur durchgeführt. Die Darstellung zeigt den Mittelwert \pm SEM und das Signifikanzniveau wurde auf 0.05 (*) festgesetzt und in dieser Graphik nicht unterschritten.

Vaskuläre Pathologie im Sinne erweiterter Kapillaren betrafen alle Gruppen gleichermaßen. Ein Fehlen von Kapillaren in ganzen perifaszikulären Arealen war hingegen vor allem bei Anti-PL-7⁺ Patienten, aber auch bei Anti-PL-12⁺ Patienten häufiger vorhanden als bei Anti-Jo1⁺ Patienten. Anti-PL-7⁺ Patienten unterschieden sich dabei signifikant von Anti-PL-12⁺ Patienten ($p < 0.01$). Die Gefäßpathologie ist in der MHC-II-Färbung in **Abbildung 8 B1-3, F und Abbildung 6 C1-2** illustriert, während fragmentiertes Bindegewebe in **Abbildung 6 C1-3, D und Abbildung 6 C3** zu sehen ist. Aufgelockertes peri- und endomysiales Bindegewebe sah man gleichermaßen bei Anti-PL-7⁺ und Anti-Jo1⁺ Patienten, während Anti-PL-12⁺ Patienten weniger von Fragmentierung des Bindegewebes betroffen waren (**Abbildung 11**). Am häufigsten war endomysiale Fibrose und perimysiale Pathologie in den Biopsien der Anti-PL-7⁺ Patienten zu sehen (78%), gefolgt von 73% in der Jo1- und 62% in der PL-12-Gruppe.

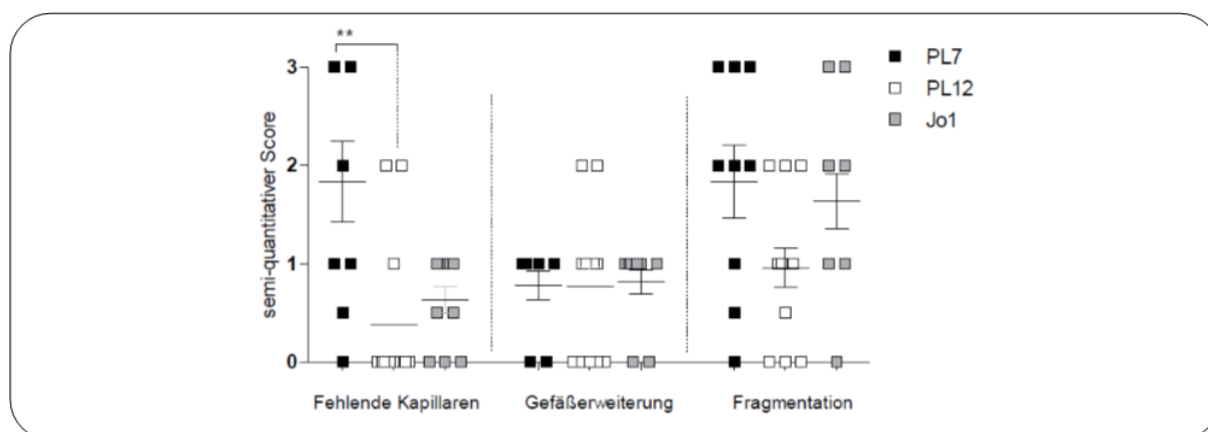


Abbildung 11: Gefäß- und Bindegewebepathologie bei ASyS

Statistische Gegenüberstellung der drei Antikörpergruppen (PL-7, PL-12, Jo1). Im Schweregrad erhoben durch einen semiquantitativen Punktescore ist die PL-7-Gruppe in den Attributen kapilläres Defizit und Fragmentierung mehr betroffen, während bei der PL12-Gruppe am häufigsten erweiterte Kapillaren gefunden werden können. Für die Auswertung der Scores mittels GraphPad Prism 5.0.2 wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließender Dunn Korrektur durchgeführt. Die Darstellung zeigt den Mittelwert \pm SEM und das Signifikanzniveau wurde auf 0.01 (**) festgesetzt.

Hochregulation von MHC-I- und MHC-II-Molekülen auf dem Sarkolemm von Muskelfasern im perifaszikulären Bereich des Muskels war in allen drei Patientengruppen zu sehen (80–90% aller Patienten). Eine flächige Färbereaktion von Teilen ganzer Faszikel in der MHC-I-Färbung war bei Jo1-Fällen am häufigsten (37% hatten einen Punktescore von 3), wohingegen die Färbereaktion in den beiden anderen Gruppen in mehr als 60% mittelstark ausgeprägt war. Lediglich in der PL-12-Kohorte gab es Patienten, die keine Hochregulierung des Oberflächenmarkers zeigten (~20%). In der MHC-II-Färbung war die Anzahl stark reagierender Biopsien in den drei Gruppen gleich häufig. In den PL-7- und Jo1-Fraktionen waren mittelstarke Färbereaktionen am häufigsten. MHC-II war bei PL-12 überwiegend nicht oder nur gering hochreguliert. Die C5b-9-Färbung war in etwa 50% der PL-7/-12-Biopsien negativ, während die restlichen Patienten eher mittelgradig ausgeprägte Komplementaktivierung zeigten. Unter den Anti-Jo1⁺ Patienten war eine stark ausgeprägte Komplementaktivierung am häufigsten und die Färbung war insgesamt nur bei drei dieser Patienten sarkolemmal negativ (**Abbildung 12**).

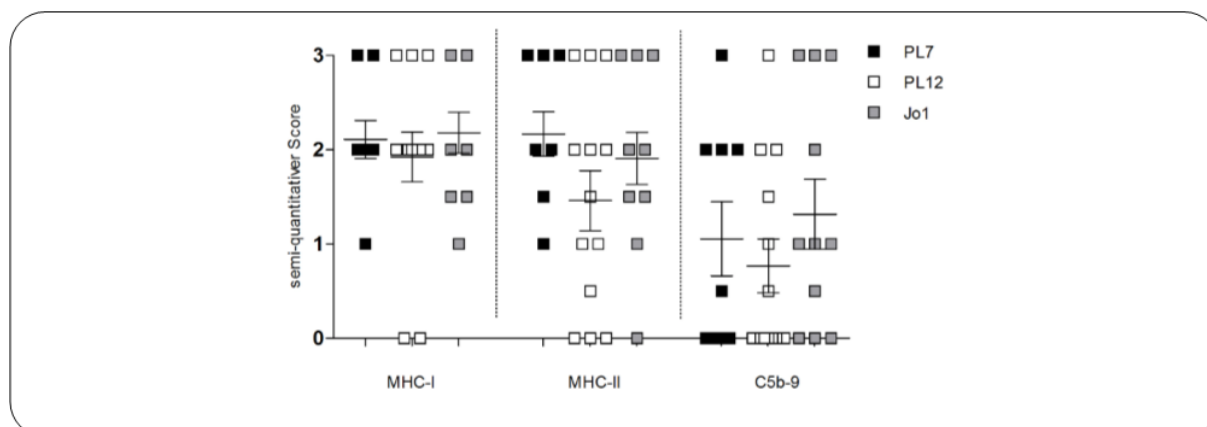


Abbildung 12: MHC-I, MHC-II-Expression und Komplementaktivierung bei ASyS

Die Biopsien der drei Kohorten wurden hinsichtlich der Expression der Oberflächenmarker verglichen (0-3 Punkte). In der Jo1-Gruppe waren alle drei Merkmale am stärksten ausgeprägt, während Anti-PL-7⁺ Patienten meist mittelstark betroffen waren. Anti-PL-12⁺-Patienten zeigen allgemein eine weniger starke Expression der Oberflächenmarker, dies sticht besonders in der Komplementaktivierung (C5b-9) hervor. Für die Auswertung der Scores mittels GraphPad Prism 5.0.2 wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließender Dunn Korrektur durchgeführt. Die Darstellung zeigt den Mittelwert \pm SEM und das Signifikanzniveau wurde auf 0.05 (*) festgesetzt, welches hier nicht erreicht wurde.

4.3 Immunezellinfiltrate und Skelettmuskelinflammation

Um das entzündliche Infiltrat, das in den Standardfärbungen bereits gesehen wurde, spezifischer zu untersuchen, wurden diese in den POD-Färbungen mit Antikörpern gegen die typischen Oberflächenmoleküle der Immunzellen sichtbar gemacht und lokalisiert. Wie in 1.2.6.1 beschrieben, geht eine Migration von Immunzellen mit der Ausschüttung von Chemokinen, Zytokinen und der Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege einher. Um diesen Vorgang und den zugrundeliegenden Pathomechanismus weiter aufzuschlüsseln, wurde zusätzlich eine mögliche, immunologisch aberrante Regulation auf molekularer Ebene untersucht.

4.3.1 Panleukozytäre Infiltrate

Zur ersten Charakterisierung des Infiltrates wurden Zellen, die den Panleukozytenmarker CD45 exprimieren, gefärbt. Mittels dieser Färbung sind bei allen 33 Patienten Leukozyten im Muskelgewebe gefunden worden. Bei 45% waren 0–4 Zellen pro Gesichtsfeld sichtbar, bei weiteren 45% 4–20 Zellen und bei 10% waren Cluster von >20 Zellen pro Gesichtsfeld zu sehen. Die Cluster kamen ausschließlich bei der Jo1-Gruppe (27% der Patienten) vor. In den PL7-Biopsien waren meist Ansammlungen von 4–20 Zellen pro Gesichtsfeld, bei der PL12-Gruppe hingegen in über 50% nur 0–4 Zellen pro Gesichtsfeld zu sehen **Abbildung 13 B1-3, D**.

In einem weiteren Schritt wurden die einzelnen Zelltypen näher charakterisiert.

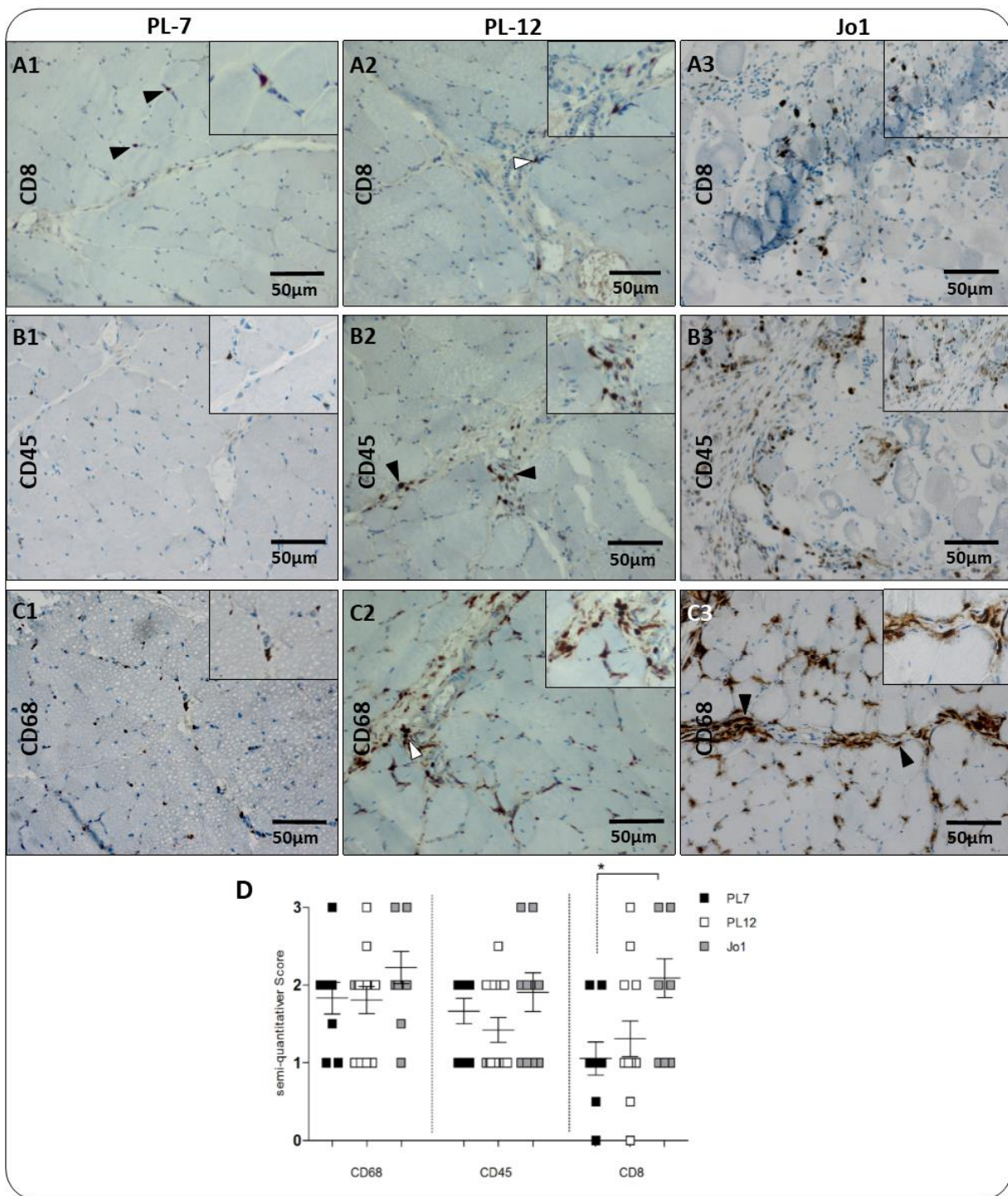


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung von Leukozyteninfiltraten bei ASyS

Abbildungen (A-C) stellen immunhistochemische Färbungen der Patientengruppen PL-7 (A1, B1, C1), PL-12 (A2, B2, C2) und Jo1 (A3, B3, C3) gegenüber. CD8⁺-Zellen (A 1-3), CD45⁺-Zellen (B 1-3) und CD68⁺-Zellen (C 1-3) wurden in unterschiedlicher Anzahl in den Gruppen gefunden: semiquantitativer Score I (A1, B1, C1), Score II (A2, B2, C2) und Score III (A3, B3, C3). Auffällig wird, dass in allen Färbungen, Schweregraden und Patientengruppen die Infiltrate hauptsächlich im peri- und endomysialen Bindegewebe (schwarze Pfeilspitzen) und perivaskulär (weiße Pfeilspitzen) vorkommen. Für die Auswertung der Scores (D) mittels GraphPad Prism 5.0.2 wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließender Dunn Korrektur durchgeführt. Die Darstellung zeigt den Mittelwert ± SEM und das Signifikanzniveau wurde auf 0.05 (*) festgesetzt.

4.3.2 Makrophageninvasion und veränderte Th2-Aktivierung

Der Hauptteil der infiltrierenden Zellen konnte bei allen Patienten als CD68⁺-Zellen, d.h. im Wesentlichen als Makrophagen identifiziert werden. Während sich in der PL-7- und PL-12-Kohorte selten (<10%) eine starke perivaskuläre sowie peri- und endomysiale Anfärbung von Makrophagen finden ließ, konnte dies bei 30% der Jo1-Fälle festgestellt werden. Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten zeigten ähnlich häufig weniger starke, aber immer noch deutliche Infiltrate in perifaszikulären und endomysialen Bereichen, während ca. ein Drittel der Anti-PL-12⁺ Patienten häufig nur leicht betroffen waren (**Abbildung 13 C1-3, D**).

Zur Einschätzung der Polarisierung der Makrophagen wurden außerdem unterschiedliche Marker auf Genebene untersucht. Mit der Ermittlung der M2-Marker (antiinflammatorisch und immunregulierend), des IL-4R (Interleukin-4-Rezeptor) und des Mannoserezeptors CD206 (Cluster of Differentiation 206, *MRC1*) in der qPCR wurde geprüft, ob eine antiinflammatorische Aktivierung von Makrophagen in Biopsien von ASyS vorliegt. Weiterhin wurde die Expression von dem auf Th2-Lymphozyten vorhandenen Chemokinrezeptor *CCR3* und dessen Ligand *CCL17* untersucht. Da T-Zellen durch IL-4, welches am Rezeptor IL-4R bindet, zur Differenzierung zu Th2-Zellen aktiviert werden, wurden sie ebenfalls auf ihre Genexpression hin untersucht. Um diese Differenzierung auf Transkriptionsebene zu klären, wurden auch die intrazellulären Transkriptionsfaktoren *STAT3* und *STAT6*, sowie die Expression von *TGFB* beurteilt.

Der IL-4-Rezeptor, an den das Th2-induzierende Zytokin IL-4 bindet, ist auf Genebene statistisch signifikant und im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe in den Gruppen PL-7 ($p < 0,01$) und PL-12 ($p < 0,01$) hochreguliert. Ebenso heben sich Anti-PL-7⁺ ($p < 0,01$) und Anti-PL-12⁺ Patienten ($p < 0,01$) durch erhöhtes Vorhandensein des *IL4R* signifikant von der Jo1-Gruppe ab, während die Anti-Jo1⁺ Patienten ein zur NDC-Kohorte kohärentes Expressionsniveau von Th2 und M2 Markern präsentiert (**Abbildung 14 B**). Zudem wurde erhoben, dass der Ligand *IL4*, der neben *IL13* eine Bindung mit eben genanntem Rezeptor eingeht, bei allen drei Patientensubgruppen gar nicht messbar ist. Eine ähnlich veränderte Reaktion wie *IL4R* zeigt *TGFB*. Während eine statistisch signifikant verstärkte Expression bei Anti-PL-7⁺ ($p < 0,001$) und Anti-PL-12⁺ Patienten ($p < 0,01$) besteht, verhält sich der Großteil der Anti-Jo1⁺ Patienten unverändert zu den Normalkontrollen (**Abbildung 14 B**). Auch bei diesem Marker sieht man zwischen der PL-7- und der Jo1-Gruppe einen signifikanten Unterschied ($p <$

0,05) der Regulierung. *STAT3* und *STAT6* zeigen sich in ihrer Genexpression im Vergleich zu den Normalkontrollen ebenfalls signifikant gesteigert, wobei *STAT3* in der PL-7 ($p < 0,01$) und PL-12 ($p < 0,01$) und *STAT6* nur in der PL-7 Gruppe ($p < 0,01$) verstärkt exprimiert wird, während in der Jo1 Gruppe zwar beide Marker leicht hochreguliert sind, hierbei jedoch nicht statistisch signifikant (**Abbildung 14 A**).

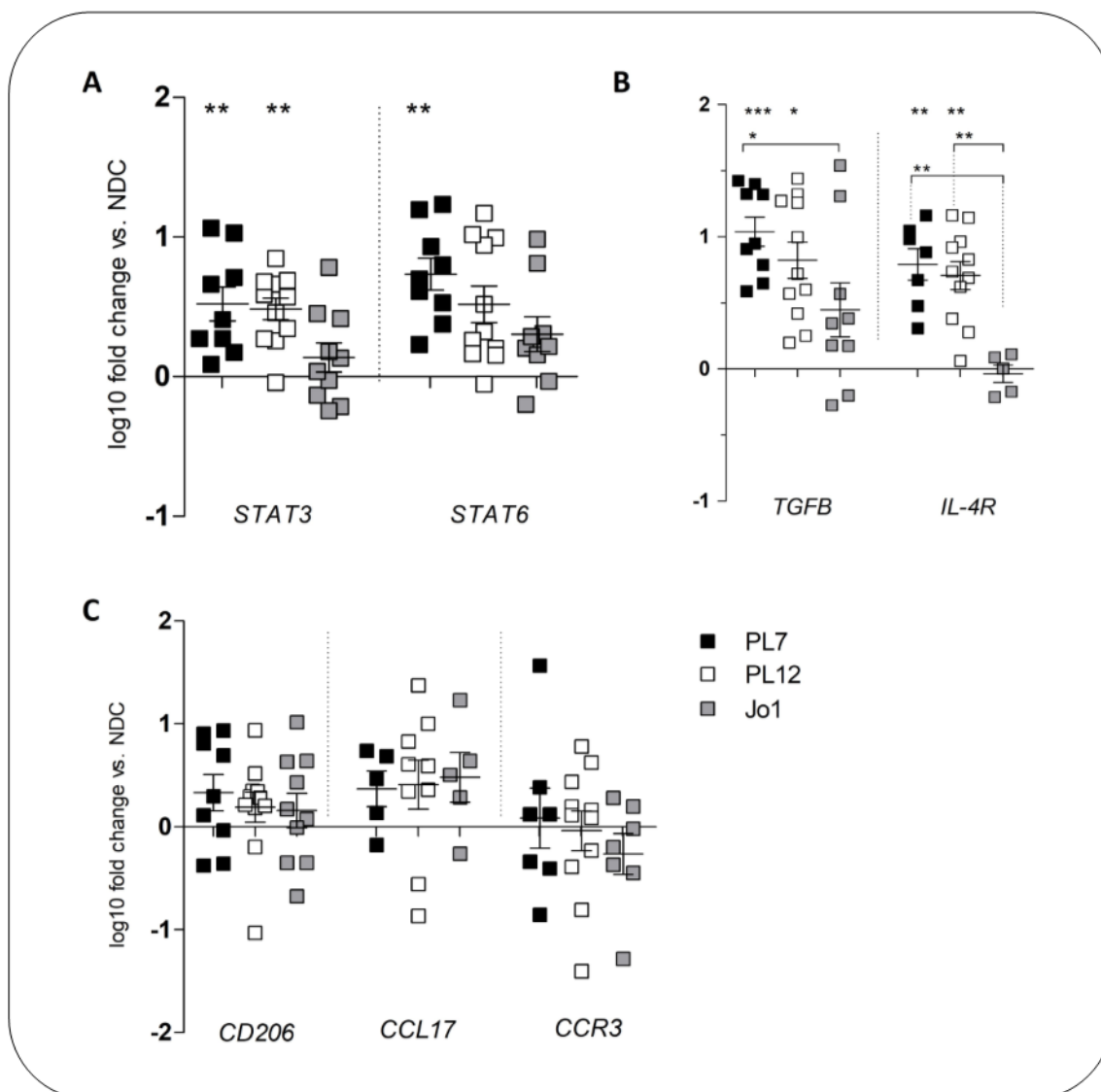


Abbildung 14: Quantitative PCR-Analyse von Genen der Th2-Zell- und Makrophagenregulation (A) zeigt die für die intrazellulären Signalwege bedeutenden Transkriptionsfaktoren *STAT3* und *STAT6*, die bei der PL-7- und PL-12-Kohorte im Vergleich zu NDC verstärkt hochreguliert sind. Signifikanz erreichen dabei PL-7 und PL-12 für *STAT3* und PL-7 für *STAT6*. (B) Die Interleukine *TGFβ* und *IL4R* sind in der PL-7 und PL-12 Kohorte signifikant verstärkt exprimiert im Vergleich zu NDC. Bei Jo1 ist lediglich *TGFβ* leicht erhöht exprimiert. Sowohl PL-7 als auch PL-12 unterscheiden sich in der *IL4*-Expression signifikant von Jo1. Die Marker für die Makrophagendifferenzierung (C) sind in allen Gruppen im selben Level wie NDC exprimiert. Für die Quantifizierung der mRNA Transkripte, mittels GraphPad Prism 5.0.2, wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließender Dunn Korrektur durchgeführt. Die Darstellung zeigt den Mittelwert \pm SEM und das Signifikanzniveau wurde auf 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***) festgesetzt.

Der Endozytoserezeptor CD206, der Makrophagen u.a. dazu aktiviert, Debris der Umgebung abzuräumen und Fibroblasten aktiviert, stellt sich in der Genexpressionsanalyse bei allen Gruppen im Vergleich zu den Normalkontrollen leicht überexprimiert dar. Der Unterschied erreichte keine Signifikanz und untereinander ähnelten sich die Gruppen in der Verteilung. Auch der Chemokinrezeptor CCR3, der u.a. auf T-Lymphozyten vorkommt, war in allen drei Gruppen gleichmäßig leicht oberhalb der Normalkontrollen exprimiert, ohne damit Signifikanz zu erreichen, während der zu CCR3 passende Liganden CCL17, der eine Th2-Differenzierung der T-Zellen bewirkt, in allen drei Gruppen ein im Vergleich zur Norm deutlich erhöhtes Genexpressionsniveau zeigte (**Abbildung 14 C**).

4.3.3 T-Zellen und veränderte Th1-Aktivierung

Da in der Vergangenheit das Vorkommen zytotoxischer T-Zellen in entzündetem Muskelgewebe ASyS-Betroffener in einigen Arbeiten thematisiert wurde, ist auch hier eine immunhistochemische Lokalisierung dieser Zellen vorgenommen worden.^{6,89} 94% aller Patienten zeigten Infiltrate zytotoxischer CD8+ T-Zellen. In 51% aller ASyS-Fälle sah man 0–4 Zellen pro Gesichtsfeld, in 27% 4–20 Zellen und in 16% kamen sie in Clustern von >20 Zellen vor. Auch hier konnten mit 36% aller Patienten, die Clusterformationen vor allem in der Jo1-Kohorte gefunden werden, mit einem signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zu PL-7, die nur in zwei Biopsien >4 zytotoxische T-Zellen pro Gesichtsfeld zeigten und in 77% weniger oder keine dieser Zellen präsentierten (**Abbildung 13 D**). Auch unter den Anti-PL-12⁺ Patienten gab es Betroffene ohne Muskelinfiltrate und auch hier waren in 70% der Biopsien <4 Zellen pro Gesichtsfeld zu sehen. Neben zwei Patienten, die Clusterformationen aufwiesen ähnelte diese Gruppe stark den Anti-PL-7⁺ Patienten (**Abbildung 13 A 1-3**).

Die Marker, die für eine proinflammatorische Th1-Aktivierung typisch sind, wurden ebenfalls in ihren Genexpressionsmustern untersucht (**Abbildung 15**). Dazu zählen neben *IFNG*, *IFNA*, *TNFA*, *IL6*, *IL1B* und *IL12* auch die intrazellulären Transkriptionsfaktoren *STAT1* und der Chemokinrezeptor *CXCR6*. Sowohl IFN- α als auch IL-12 wurde in keiner der drei Erkrankungsgruppen exprimiert. Sowohl IFN- γ (anti-PL-7⁺: $p < 0,05$; anti-PL-12⁺: $p < 0,01$; anti-Jo1⁺: $p < 0,01$) als auch TNF α (anti-PL-7⁺: $p < 0,05$; anti-PL-12⁺: $p < 0,05$; anti-Jo1⁺: $p < 0,05$) sind in allen drei Gruppen stark hochreguliert, und signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch IL-6 ist in allen drei Gruppen stark hochreguliert, hier zeigt aber nur die Jo1-Gruppe Signifikanz gegenüber

der Kontrollgruppe ($p < 0,5$). Umgekehrt verhält es sich bei $IL-1\beta$, das zwar auch in allen Gruppen hochreguliert ist, eine signifikante Steigerung des Genprodukts aber nicht für die Anti-Jo1⁺ Patienten, sondern für die Anti-PL-7⁺ ($p < 0,01$) und Anti-PL-12⁺ Patienten ($p < 0,5$) zutrifft. Auch *CXCR6* ist in allen Gruppen verstärkt exprimiert, erreicht aber nur in der PL-12-Gruppe ($p < 0,05$) statistische Relevanz. STAT1 ein Transkriptionsfaktor, der nach $IFN-\gamma$ Stimulation die Th1-Aktivierung von intrazellulär anstößt ist bei allen Patienten signifikant erhöht exprimiert (anti-PL-7⁺: $p < 0,01$; anti-PL-12⁺: $p < 0,01$; anti-Jo1⁺: $p < 0,05$).

Sämtliche Marker, die analysiert wurden, um eine Aktivierung der Th17-Zellreihe (*IL12*, *IL21*, *IL17*) zu untersuchen, sind bei allen drei Patientengruppen nicht exprimiert.

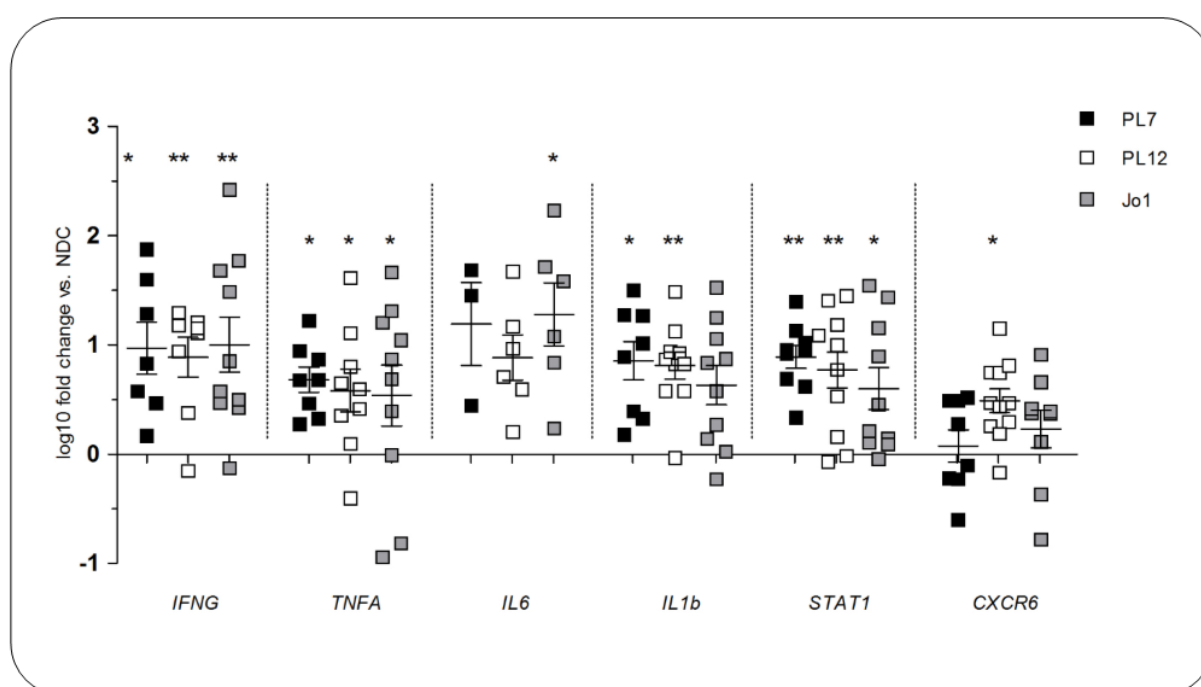


Abbildung 15: Quantitative PCR-Analyse von Genen der Th1- und Th17-Zelleregulation

Die dargestellten Genmarker lösen bei aktivierten T-Zellen eine Th1-Differenzierung aus. Alle gemessenen Interleukine, Wachstumsfaktoren und Chemokine werden in den Gruppen in vergleichbarem Maße überexprimiert, wobei die meisten Gene signifikant erhöht sind im Vergleich zu NDC. Für die Quantifizierung der mRNA Transkripte, mittels GraphPad Prism 5.0.2, wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließender Dunn Korrektur durchgeführt. Die Darstellung zeigt den Mittelwert \pm SEM und das Signifikanzniveau wurde auf 0.05 (*) und 0.01 (**) festgesetzt.

4.4 Die Schlüsselrolle der B- und Plasmazellen

Eine Infiltration von B Zellen ist in entzündlichen Muskelerkrankungen eher selten zu sehen (eine Ausnahme bilden Anti-Mi2⁺-Patienten), jedoch geben aktuelle Forschungs-arbeiten Hinweise auf eine Beteiligung in der Pathogenese des AsyS. Daher wurden auch diese Zellen intensiv in dieser Arbeit untersucht.¹⁰⁶

4.4.1 Infiltrate von CD20⁺-Zellen

Durch Färbung des CD20-Oberflächenmarkers konnten B-Zellen in den Biopsien des Muskelgewebes zur Darstellung gebracht werden. Infiltrate dieser Zellen waren bei allen drei Krankheitsgruppen vorhanden und heterogen verteilt (**Abbildung 17 A1-3**). 70% aller Patienten hatten B-Zellinfiltrate. Bei 40% der ASyS Patienten konnten 4–20 Zellen pro Gesichtsfeld und bei 24% 0–4 Zellen gezählt werden. Mit 5 Patienten ohne B-Zellinfiltrate (38%) in der PL-12- und 4 Patienten (44%) in der PL-7-Gruppe, sowie vereinzelt vorkommenden Zellen und einigen Zellgruppierungen in den übrigen Fällen, stellten sich die beiden Kohorten verglichen mit der Jo1-Gruppe weniger, PL-12 ($p < 0,5$) sogar signifikant weniger, betroffen dar. Es gab nur einen Anti-Jo1⁺ Patienten ohne B-Zellinfiltrate, überwiegend konnten 4–20 Zellen pro Gesichtsfeld gesehen werden (>60%), bei zwei Patienten konnten Clusterformationen von >20 Zellen nachgewiesen werden, die in den beiden anderen Gruppen fehlten (**Abbildung 17 C**). In der Intensität der B-Zellinfiltration unterschieden sie sich signifikant von der Gruppe der Anti-PL-12⁺ Patienten. B Zell Follikel fanden sich jedoch nicht.

Um eine veränderte genetische Regulierung in der B-Zell-Linie zu untersuchen, wurde die Expression der für die Chemotaxis der B-Zellen wichtigen Chemokinrezeptoren (*CXCR5*) und Liganden (*CXCL13*) gemessen. Das Chemokin *CXCL13*, das zur Anlockung von B-Zellen dient, war bei allen drei Patientengruppen hochreguliert, ein signifikant erhöhtes Niveau wurde aber nur bei den Anti-Jo1⁺ Patienten ($p < 0,001$) deutlich. Der auf Lymphozyten vorkommende CXC-Rezeptor-5 war in allen Kohorten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen nicht verändert reguliert (**Abbildung 16 B**). Auch die B-Zell- und Plasmazellaktivatoren *APRIL* und *BAFF* wurden in ihrem Expressionsmuster untersucht. Sie waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollen deutlich erhöht, innerhalb der Gruppen im Vergleich jedoch ohne Unterschiede (**Abbildung 16 C**).

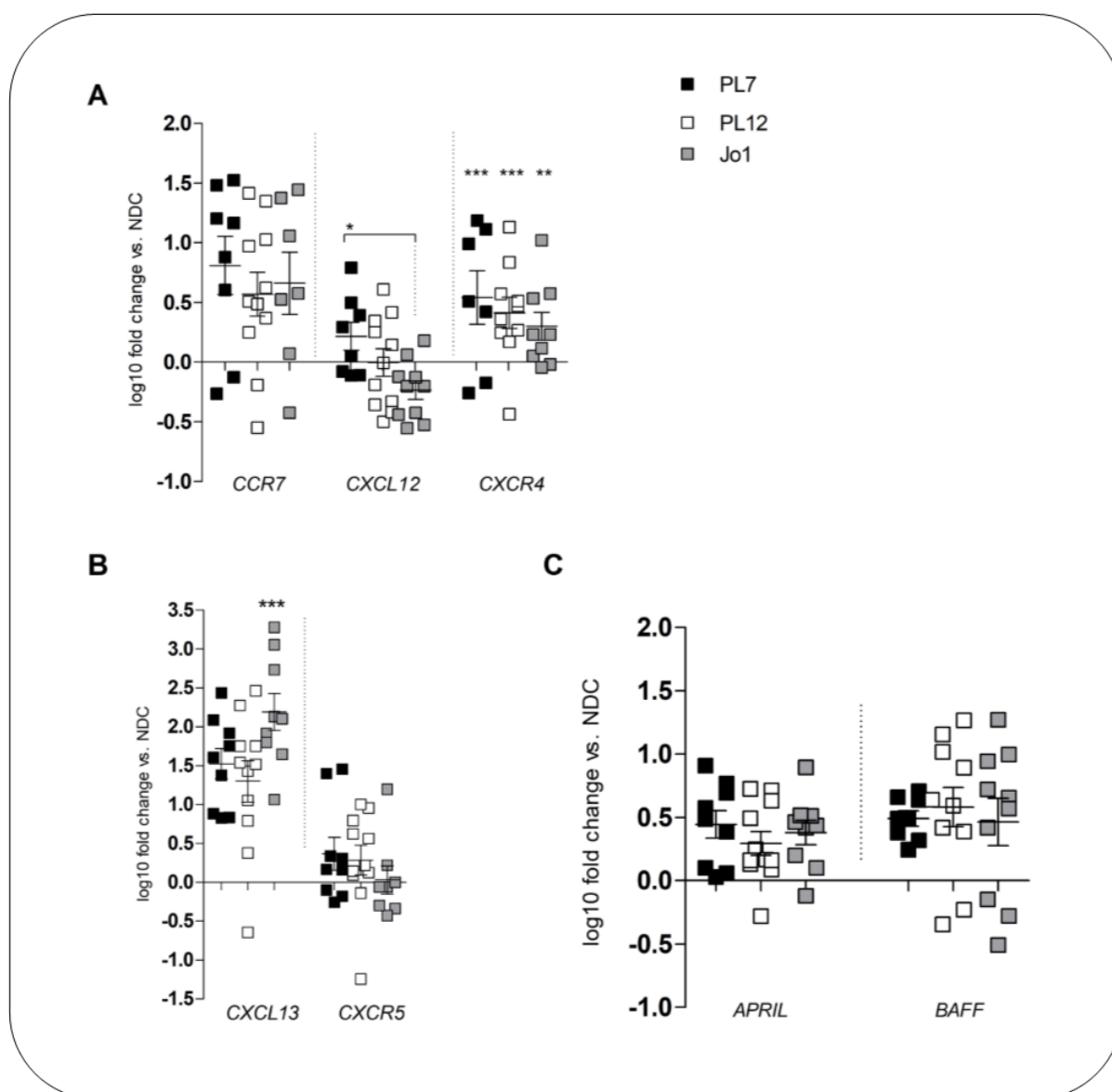


Abbildung 16: Quantitative PCR von Genen der P- und B-Zellregulierung bei ASyS

(A) demonstriert Chemokinmarker welche, die Diapedese von Plasmazellen beeinflussen. Der Chemokinrezeptor CXCR4 ist in allen drei Gruppen signifikant hochreguliert gegenüber NDC, während der Chemokinligand CXCL12 in etwa auf dem Niveau der NDC ist und keine signifikante Erhöhung zeigt. Zu bemerken ist hier jedoch, dass die Expression in der PL-7 Kohorte leicht verstärkt und im Vergleich zu Anti-Jo1⁺ Patienten signifikant erhöht ist. Die Expression von CCR7 ist in allen Gruppen sehr variabel, im Trend zeigt sich eine Überexpression, die aufgrund der Streuung der Werte aber keine Signifikanz erreicht (B) zeigt Chemokinmarker der B-Zell-Diapedese. Während der Rezeptor CXCR5 in allen Gruppen gegenüber NDC unverändert exprimiert wird, sieht man bezüglich des Liganden CXCL13 eine starke Überexpression, die im Falle von Anti-Jo1⁺ Patienten sogar eine Signifikanz erreicht. (C) stellt die Genexpression der B- und P-Zellstimulatoren APRIL und BAFF dar. Es zeigt sich für beide Marker eine alle Gruppen betreffende Überexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für die Quantifizierung der mRNA Transkripte, mittels GraphPad Prism 5.0.2 wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließender Dunn Korrektur durchgeführt. Die Darstellung zeigt den Mittelwert ± SEM und das Signifikanzniveau wurde auf 0.05 (*), 0.01 (**) und 0.001 (***) festgesetzt.

4.4.2 Plasmazellinfiltrate und „homing“

Aus B-Gedächtniszellen, kann sich nach der Re-Aktivierung durch das spezifische Antigen, neben den kurzlebigen Plasmazellen ein Pool aus sogenannten Plasmablasten entwickeln, die auch Antikörper sezernieren und durch IFN- γ stimuliert in den Blutkreislauf wandern, bis sie angelockt von dort exprimierten Chemokinenliganden (CXCL12), in entzündliche Gewebe oder das Knochenmark emigrieren. Dort werden sie, nach Bindung durch ihre Chemokinrezeptoren (CXCR4, CXCR3) zu ortsgebundenen langlebigen Plasmazellen. Diese „Langlebigkeit“ wird ähnlich wie bei Gedächtnis-B-Zellen durch die Zellaktivatoren BAFF und APRIL und zudem durch IL-6 ausgelöst. Entzündliches Gewebe, das so zu Nischen für langlebige Plasmazellen wurde, bildet sich nach Abheilung zurück, wohingegen das Knochenmark eine dauerhaft persistierende Nische für langlebige Plasmazellen darstellen kann.

Die Darstellung der CD138⁺ Plasmazellen, ergab in den Gruppen das folgende Bild. Insgesamt hatten 85% der Patienten zahlreiche Plasmazellinfiltrate. Bei 36% der 33 Patienten konnte man 0–4 Zellen pro Gesichtsfeld in den Biopsien identifizieren, bei 24% 4–20 Zellen und gehäuft kamen auch Cluster von >20 Plasmazellen pro Gesichtsfeld vor (25% aller Patienten). Bei 44% der Anti-PL-7⁺ Patienten waren Cluster zu sehen. Anti-PL-12⁺ Patienten zeigten die geringsten Infiltrate. Biopsate von Anti-Jo1⁺ Patienten waren etwas weniger betroffen als diejenigen von Anti-PL-7⁺ Patienten (**Abbildung 17 B1-3, C**).

Zusätzlich zu einer zytoplasmatischen Färbung mit CD138 wurde auch eine Kernfärbung mit MUM1 (multiple myeloma oncogen 1) durchgeführt. Dieser Kernmarker aus der Interferon-Regulationsfaktoren-Familie wird auf Plasmazellen und in geringem Maße auf Keimzentrumszellen („germinal center exit B cells“) exprimiert. Standardmäßig wird die Färbung vor allem an in Paraffin eingebetteten Gewebsproben durchgeführt. Bei dem von uns benutzten Cryomaterial hat diese Art der Färbung technisch bedingt in einer Vielzahl der Fälle leider nicht in befriedigender Qualität funktioniert (63% aller Patienten). Bei den gelungenen Färbungen konnten MUM1⁺-Zellen vermehrt bei Anti-Jo1⁺, gefolgt von Anti-PL-7⁺ Patienten, gezählt werden, während sie bei Anti-PL-12⁺ Patienten seltener zu finden waren (**Abbildung 17 C**).

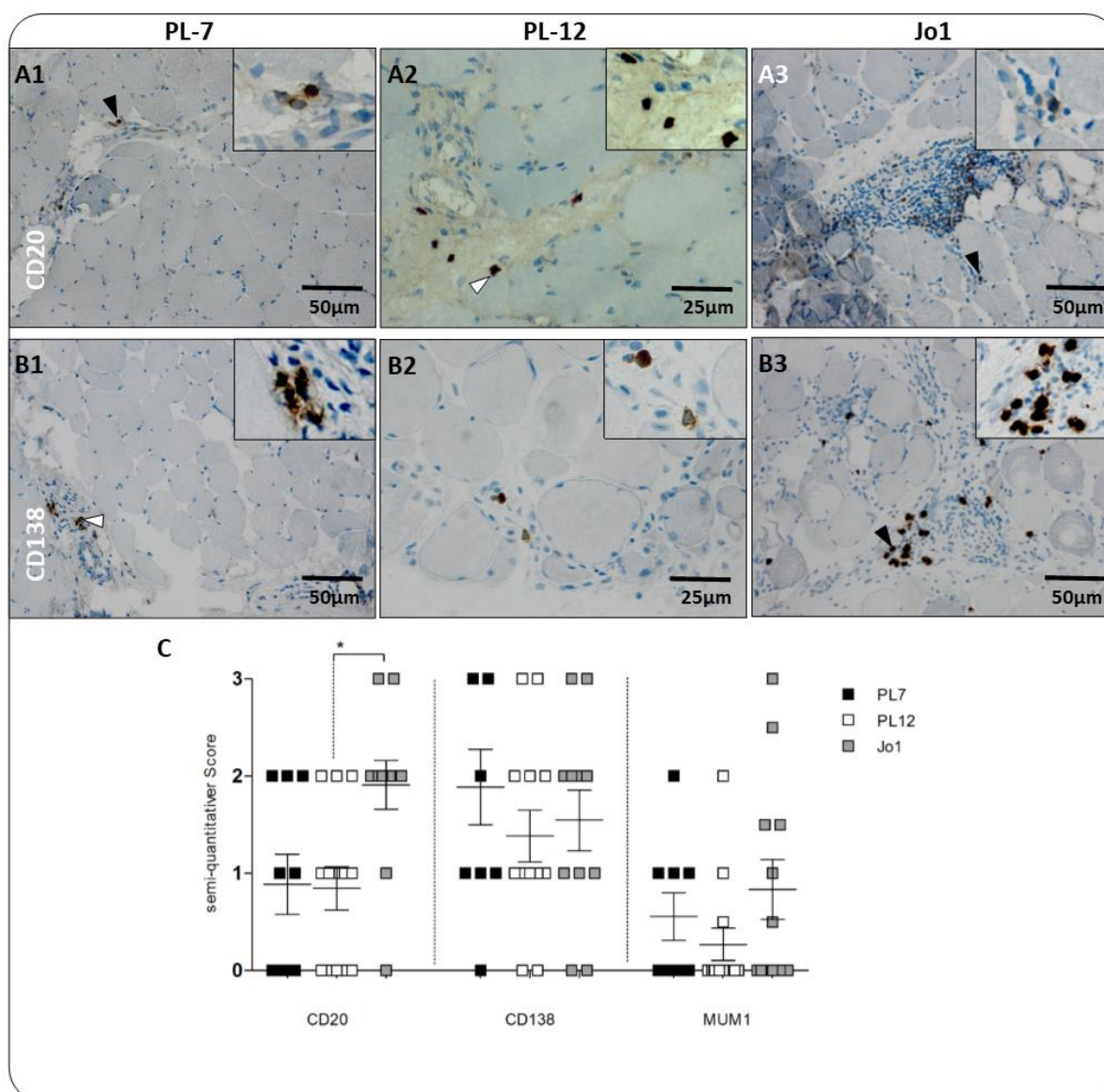


Abbildung 17: Plasmazell- und B-Zellinfiltration im Muskelgewebe bei ASyS

(A1-3) und (B1-3) stellen die Patientengruppen Anti-PL-7, -PL-12 und -Jo1 gegenüber. CD20⁺-Zellen (A1-3) und CD138⁺-Zellen (B1-3) wurden in unterschiedlicher Anzahl gefunden. Exemplarische Darstellung des semiquantitativen Score I (A2, B2), Score II (A1, B1) und Score III (A3, B3), genaue Auswertung siehe (C). Die Infiltrate sind in beiden Färbungen und in allen Patientengruppen peri- und endomysial (schwarze Pfeilspitzen) betont und perivaskulär (weiße Pfeilspitzen) zu finden. Abbildung (C) zeigt die statistische Auswertung der Scores mittels GraphPad Prism 5.0.2. Neben der Bewertung der B- und P-Zellinfiltrate anhand von CD20 und CD138 wurde die MUM1⁺-Färbung evaluiert. In 63% war die MUM1-Färbung technisch bedingt nicht möglich, diese Patienten erhielten den Score 0. Für die Auswertung der Scores wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließender Dunn Korrektur durchgeführt. Die Darstellung zeigt den Mittelwert ± SEM und das Signifikanzniveau wurde auf 0.05 (*) festgesetzt.

Die Rezeptoren *CXCR4* und *CCR7* werden von B-Zellen und daraus entstehenden Plasmablasten exprimiert und spielen eine Rolle im sogenannten „homing“ der Plasmablasten und der Entstehung von langlebigen Plasmazellen in bestimmten Körnernischen. Der dazu passende Ligand, ein Chemokin zur Anlockung der Lymphozyten, heißt *CXCL12*. Sehr interessant ist eine signifikant vermehrte *CXCR4*-

Expression in allen drei Kohorten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (anti-PL-7⁺: p<0,001; anti-PL-12⁺: p<0,001; anti-Jo1⁺: p<0,01). Untereinander verglichen war das Expressionsniveau von CXCL12 bei PL-7- gegenüber Anti-Jo1⁺ Patienten signifikant erhöht (p < 0,05), die Expression bei PL12 Patienten lag zwischen den beiden anderen Gruppen. CCR7 zeigt sich in allen Kohorten sehr variabel, im Trend aber eher überexprimiert. Aufgrund der Streuung der Werte wird jedoch keine Signifikanz erreicht (**Abbildung 16 A**).

4.4.3 Chemotaxis in entzündete Skelettmuskulatur

Tabelle 13: Chemokine und Zellen die sie exprimieren

Aufgeführt sind die Chemokinrezeptoren- und liganden, die im „homing“-Prozess von B-, T-, und P-Zellen und der Interaktion dieser Zellen mit der Umgebung eine Rolle spielen. In der obersten waagerechten Spalte sind die Zelltypen, die den jeweiligen Rezeptor oder Ligand exprimieren gelistet.

	B-Zell-Reihe	T-Zell-Reihe	P-Zellen-Reihe	Stromazellen: Knochenmark, entzündliche Gewebe (z.B. Muskel)	Progenitorzellen z.B. im Muskel, ZNS
CXCR3	Keine Interaktion bekannt	Th1-Zellen zur Migration via CXCL10/11	PZ nach Migration und Differenzierung aus Plasmablasten	Keine Interaktion bekannt	Keine Interaktion bekannt
CXCR4	B-Zellen zur Migration via CXCL12	T-Gedächtniszellen und Th2-Zellen zur Migration via CXCL12	Plasmablasten zur Migration ins Knochenmark oder entzündliche Gewebe via CXCL12	Keine Interaktion bekannt	Um während der Embryonalentwicklung und später bei Zellstress via CXCL12 ins Zielgewebe zu migrieren
CXCR5	B-Zellen, um in sekundär lymphatisches Gewebe zu migrieren	T-Helfer-Zellen, um zur B-Zell-Hilfe in den Lymphfollikel zu migrieren	Keine Interaktion bekannt	Keine Interaktion bekannt	Keine Interaktion bekannt
CCR7	Von B-Zellen, um via CCL19/21 in lymphatisches Gewebe zu migrieren	Von T-Helfer-Zellen, um via CCL19/21 in lymphatisches Gewebe zu migrieren	Keine Interaktion bekannt	Keine Interaktion bekannt	Keine Interaktion bekannt
CXCL 9/10/11	Keine Interaktion bekannt	Keine Interaktion bekannt	Keine Interaktion bekannt	Von Stromazellen und Makrophagen als Liganden, zur Anlockung von CXCR3 ⁺ -Zellen	Keine Interaktion bekannt
CXCL12	Von B-Zellen als Überlebenssignal für Plasmazellen	Keine Interaktion bekannt	Keine Interaktion bekannt	Von Stromazellen und Makrophagen als Liganden, zur Anlockung von CXCR4 ⁺ -Zellen	Keine Interaktion bekannt
CXCL13	Keine Interaktion bekannt	Keine Interaktion bekannt	Keine Interaktion bekannt	Von Stromazellen und Makrophagen als Liganden, zur Anlockung von CXCR5 ⁺ -Zellen	Keine Interaktion bekannt

Aufgrund der unter den Chemokinliganden herrschenden sogenannten „Promiskuität“ bezüglich ihrer Ligand-Rezeptorinteraktion (mehrere Liganden können am selben Rezeptor wirken) wurde zur Klarheit **Tabelle 13** erstellt. Im nächsten Schritt haben wir näher spezifiziert welche Immunzellen für das Anlocken der B-/P-Zellen verantwortlich sind, und wie diese interagieren. Dazu wurden in Muskelgewebe der Patienten die Chemokinliganden CXCL12 und CXCL13 und der Chemokinrezeptor CXCR4 immunhistochemisch angefärbt. Es zeigte sich, dass in im entzündeten Muskel aller drei Patientenkohorten Zellen vorhanden waren die diese Chemokinrezeptoren bzw. -liganden exprimieren (**Abbildung 18 A-C**). Es wurden exemplarisch aus jeder Gruppe drei Patientenproben angefärbt.

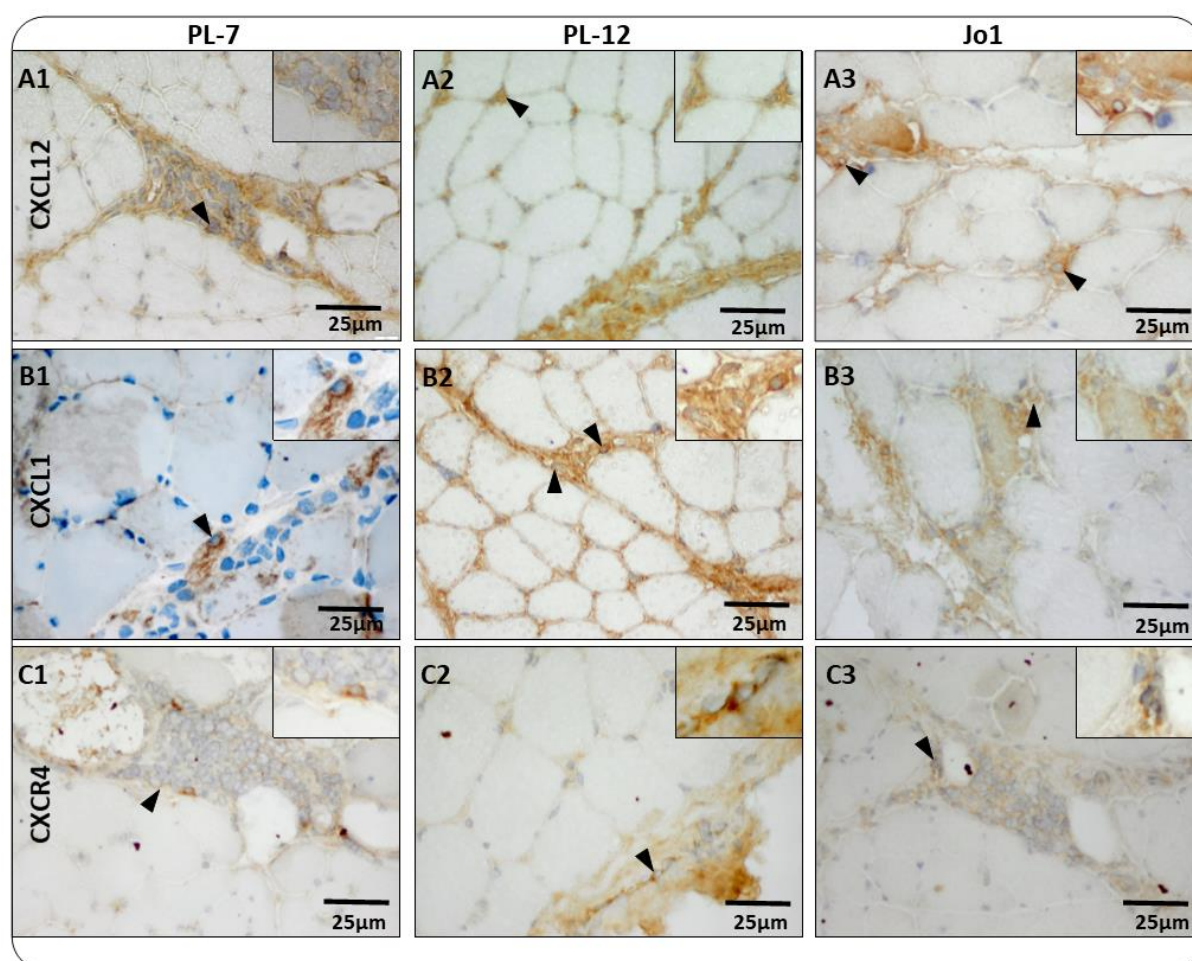


Abbildung 18 Färbungen von Chemokinliganden und -rezeptoren im Muskelgewebe bei ASyS
 In (A1-3) und (B1-3) sind Färbungen mit Antikörpern gegen die Chemokinliganden CXCL12 und CXCL13 zu sehen. (C1-3) zeigt die Anfärbung des Chemokinrezeptors CXCR4. In allen drei Antikörpersubgruppen konnten im Muskelgewebe CXCL12⁺/13⁺ und CXCR4⁺-Zellen gefunden werden, diese wurden jeweils in den kleinen Fenstern, rechts oben im Bild, vergrößert dargestellt.

Im nächsten Schritt sollte näher bestimmt werden, welche Zellen diese Chemokine exprimieren. Dazu wurden Immunfluoreszenzdoppelfärbungen mit Antikörpern gegen

CXCL13, CXCR4 und CXCL12 und verschiedenen Oberflächenmolekülen von Leukozyten (CD138, CD4, CD8, CD68) durchgeführt. Es wurden dieselben Proben, die bereits ein positives Ergebnis in der immunhistochemischen Chemokinfärbung gezeigt hatten verwendet.

CXCL12 konnte zwar nicht auf der Zellmembran von CD4⁺-Zellen nachgewiesen werden, allerdings, war das umliegende Gewebe dieser Zellen stark rot (CXCL12⁺) gefärbt (was für Chemokine durchaus typisch sein kann) (**Abbildung 19 A**).

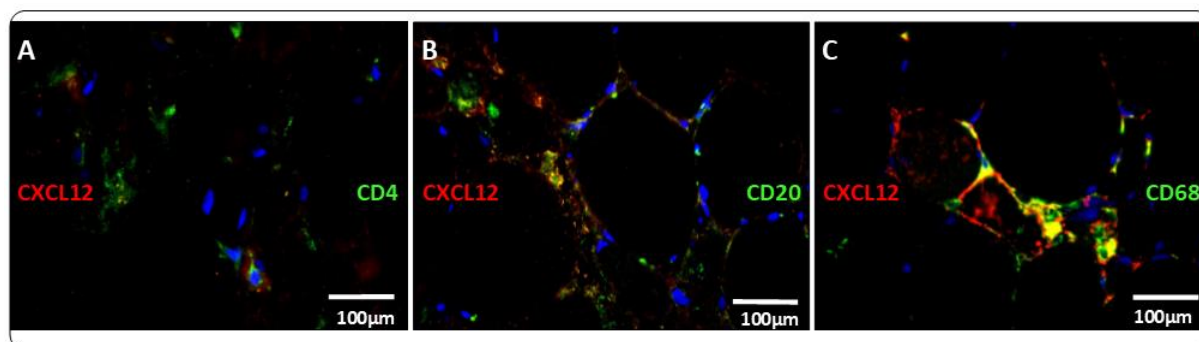


Abbildung 19: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von CXCL12 kombiniert mit CD4, CD20 & CD68
A: In der Umgebung von CD4⁺ T-Helfer-Zellen (grün) ist eine Expression des Liganden CXCL12 (rot) zu detektieren. **B:** Während CD20⁺ B-Zellen (rot) den Liganden CXCL12 (grün) auf der Zelloberfläche tragen, was durch die Ko-Expression und somit gelbe Färbung zu erkennen ist. **C:** Auch CD68⁺ Makrophagen ko-exprimieren CXCL12, was durch die gelbe Färbung ersichtlich ist. In allen Aufnahmen sind die Zellkerne durch DAPI blau dargestellt.

Im Gegensatz zu T-Zellen konnte eine klare Expression von CXCL12 auf CD20⁺-B Zellen nachgewiesen werden. Dies zeigt sich durch die Doppelpositivität in **Abbildung 19 B**. Ein ähnliches Bild zeigen Makrophagen in dieser Färbung (siehe **Abbildung 19 C**). Die CD68⁺-Zellen (grün) exprimieren ebenfalls den CXCL12-Chemokinliganden (rot), so dass sich die Coexpression als gelbe Färbung zeigt.

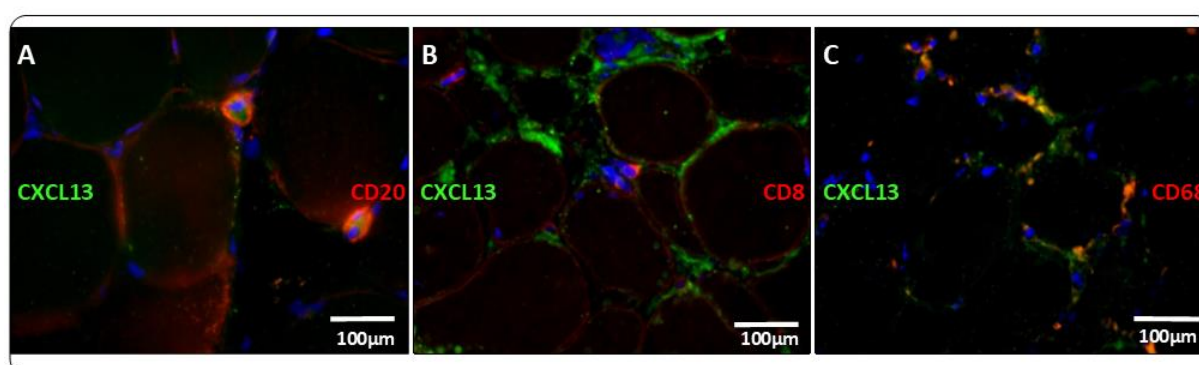


Abbildung 20: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von CXCL13 kombiniert mit CD20, CD8 & CD68
A: CD20⁺ B-Zellen (rot) ko-exprimieren den Liganden CXCL13 (grün) auf ihrer Zelloberfläche, was durch eine Orangefärbung sichtbar wird. **B:** CD8⁺ Zytotoxische-T-Zellen (rot) hingegen exprimieren kein CXCL13, der Ligand ist lediglich in der Umgebung anderer Zellen in grün zu sehen. **C:** Während CD68⁺ Makrophagen (rot) ebenfalls CXCL13 auf der Oberfläche tragen, was wiederum durch die orange Färbung zu erkennen ist. In allen Aufnahmen sind die Zellkerne durch DAPI blau dargestellt.

Die Aufnahmen zeigten außerdem, dass der Ligand CXCL13 von CD20⁺-Zellen gebildet wird, was mittels Orangefärbung in **Abbildung 20 A** zu sehen ist.

Dass CD8⁺-Zellen bei ASyS kein CXCL13 exprimieren ist in **Abbildung 20 B** veranschaulicht, durch die Rotfärbung der Zellmembran zytotoxischer T-Zellen, welche eindeutig ersichtlich ist, während die Färbung von CXCL13 lediglich diffus im Hintergrund zu sehen ist.

CD68⁺-Zellen erscheinen durch eine gleichzeitige Expression des Liganden CXCL13 gelblich (**Abbildung 20 C**).

4.5 Aktinaggregation und -shuttling

Vor dem Hintergrund unserer früheren Ergebnisse bezüglich Aktinaggregatbildung in den Myonuklei von Patienten mit ASyS wurde neben ultrastrukturellem Bildmaterial die Expression von Genen, die in den Aktinstoffwechsel involviert sind, untersucht.⁵⁴

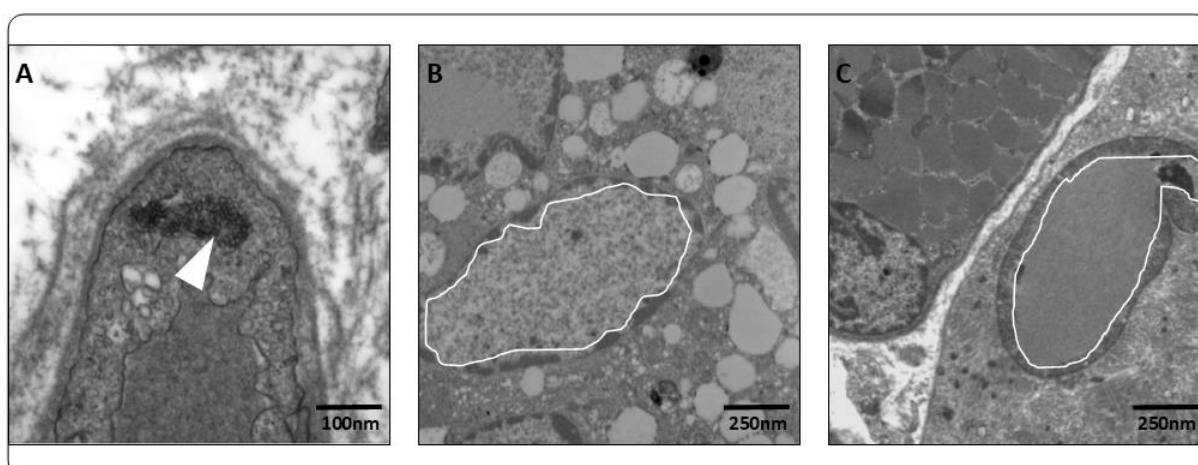


Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Charakteristika bei ASyS

(A) Zeigt undulierende Tubuli in einer Gefäß-/Kapillarendothelzelle (weiße Pfeilspitze) und **(B, C)** myonukleäre Aktineinschlüsse (weiße Umrandungen) der Skelettmuskelfasern. Beides sind Merkmale, die in allen drei Patientengruppen vorhanden sind. In der Jo1-Kohorte sind sie jedoch am häufigsten anzutreffen. Zur Visualisierung wurden hier exemplarisch Jo1⁺-Patienten gewählt.

In den EM-Bildern (**Abbildung 21**) ist zu sehen, dass bei Anti-Jo1⁺ Patienten in den Biopsaten in 70% intranukleäre Aktineinschlüsse in Myonuklei zu finden waren und in 30% undulierende Tubuli in Gefäßendothelien. Bei Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten waren nur in 10% intranukleäre Aktineinschlüsse in Myonuklei aber in 40% undulierende Tubuli in Gefäßendothelien detektierbar. Um die Ursache der Aktineinschlüsse näher zu beleuchten, bzw. um einen Vergleich der in unserer Studie von 2015 beschriebenen Veränderungen bei Anti-Jo1⁺ mit der Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Kohorte vorzunehmen wurde die nukleäre und die zytoplasmatische RNA-Fraktion isoliert und auf genetischer Ebene die relevanten Moleküle, welche in

Aktinpolymerisation und Aktinshuttling involviert sind, in den drei Gruppen bestimmt (**Abbildung 22**). Gemessen wurden das Aktin-like Peptide-2/3 (Arp2/3), welches neben der Stimulation der Aktingerüstbildung, mit β -Aktin in der Transkription den Initiationskomplex bildet, und N-WASP, ein Protein aus der Wiskott-Aldrich-Syndrome-Familie, welches Arp2/3 induziert, sowie das Cytoplasmic protein NCK1 welches wiederum N-WASP aktiviert. Während das zytoplasmatische Aktin schon seit langem als Strukturprotein bekannt ist wurde in jüngsten Untersuchungen bestätigt, dass Aktin unter verschiedenen Bedingungen z.B. Zellstress (hitzeschockinduziert), einer Virusinfektion oder zum Transport von mRNA in der Proteinbiosynthese zwischen Zytoplasma und Nukleus hin- und herverlagert werden kann („shuttling“). Für diese Aktion benötigte es Hilfsproteine, die hier auch quantitativ auf molekularer Ebene gemessen wurden, respektive Cofilin-2 (CFL2) und Importin-9 (*IPO9*) für den Import und Profilin-2 (*PFN2*) und Exportin-6 (*XPO6*) für den Export.

Dabei konnte zunächst bestätigt werden, dass mRNA von *ACTA1* (alpha 1-Aktin) und *ACTB* (beta-Aktin) sowohl im Zytoplasma als auch nukleär bei allen Patienten vorhanden ist. Während im Zytoplasma bei allen drei Patientengruppen die Expression von *ACTA1* gleichermaßen vermehrt ist, so ist die Expression von *ACTA1* im nukleären Anteil in allen Gruppen reduziert. In der Jo1-Gruppe war dieser Unterschied zwischen nukleärer und zytoplasmatischer Expression bei den Genen *ACTA1*, *N-WASP* und *IPO9* statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Nukleär war Aktin nur in der Jo1-Kohorte eindeutig vermehrt vorhanden zu messen und auch die Genexpression von *N-WASP* (*WASL*) und *ACTR2* (*Arp2*), war bezüglich des zytoplasmatischen Niveaus erhöht exprimiert. *NCK1*, war bei Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten weder im Zytoplasma noch nukleär exprimiert und in der Jo1-Gruppe im Vergleich zu den NDC leicht überexprimiert (nicht graphisch dargestellt).

Bezüglich der am „shuttling“ beteiligten Transportproteine konnte nur *IPO9* (Importin-9) sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus erhöht gemessen werden. Dies galt für alle drei Patientengruppen. Dem gegenüber waren die Marker für den Export aus dem Nukleus *XPO6* (Exportin-6) und dessen Kofaktor *PFN2* (Profilin-2) nur in der zytoplasmatischen Fraktion in allen drei Patientengruppen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen hochreguliert exprimiert und der Kofaktor von Importin, das *CFL2* (Cofilin-2) im Vergleich zu den Normalkontrollen im Zytoplasma unverändert und im Nukleus vermindert exprimiert.

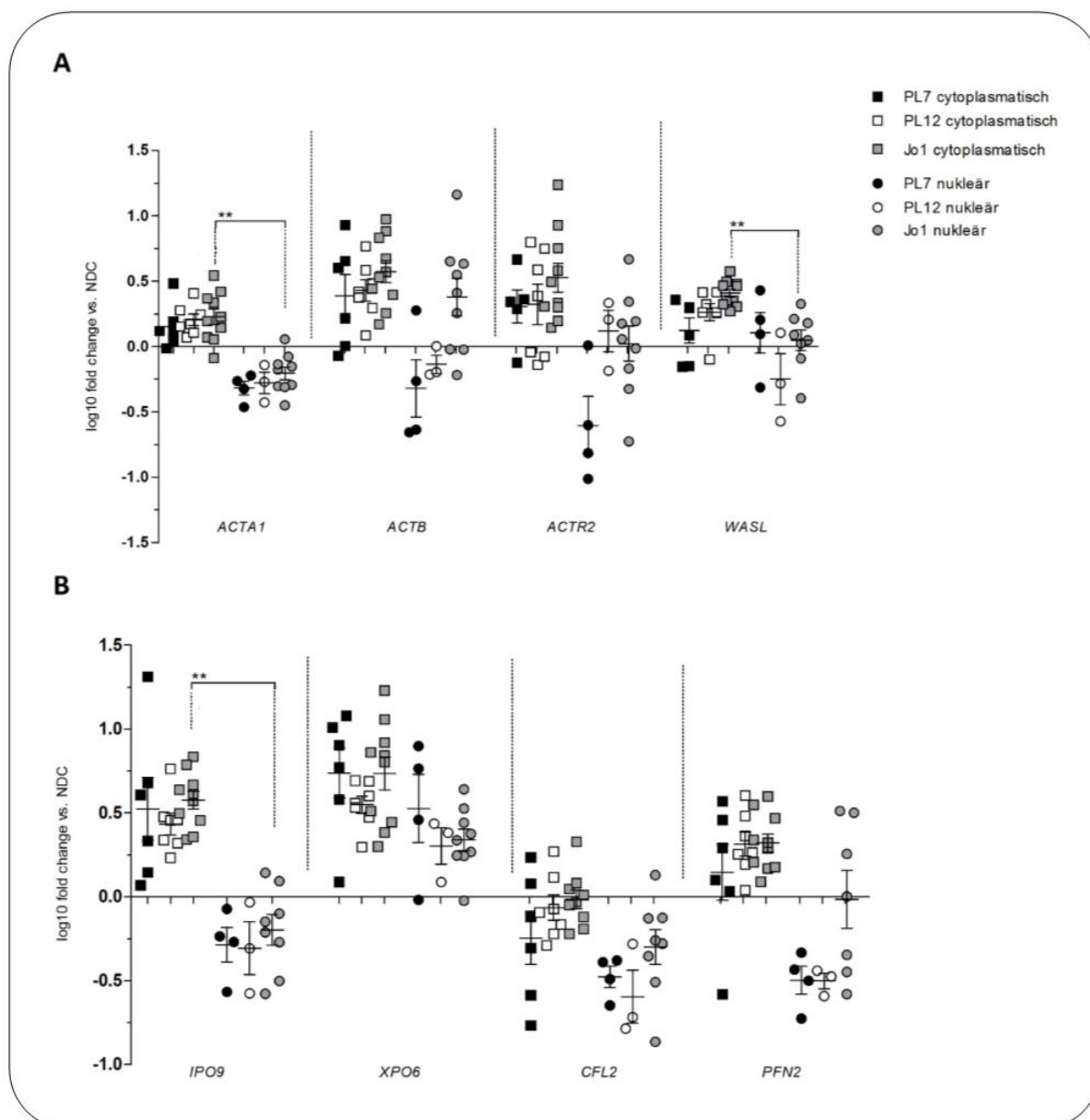


Abbildung 22: Quantitative PCR-Analyse der Gene für Aktinpolymerisation und –„shuttling“ bei ASyS
 Abbildung (A) stellt die Expression von Genen, die im Zusammenhang mit der Aktinpolymerisation vorkommen dar. Im Zytoplasma ist die Expression der untersuchten Gene in allen drei Kohorten gesteigert, während dies im Nukleus nicht der Fall ist, die Expression befindet sich hier auf dem Niveau der NDC. Ausnahme dabei ist die Expression von ACTB in Anti-Jo1⁺ Patienten, wo die Expression ebenfalls verstärkt ist. Abbildung (B) zeigt Marker von Genen die das „shuttling“ von Aktin in und aus dem Nukleus regulieren. Im Vergleich zu den NCD sind die Marker für den Export aus dem Nukleus XPO6 (Exportin-6) und dessen Kofaktor PFN2 (Profilin-2) nur in der zytoplasmatischen Fraktion in allen drei Patientengruppen hochreguliert exprimiert. Für die Quantifizierung der mRNA Transkripte, mittels GraphPad Prism 5.0.2, wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließender Dunn Korrektur durchgeführt. Die Darstellung zeigt den Mittelwert ± SEM und das Signifikanzniveau wurde auf 0.05 (*) und 0.01 (**) festgesetzt.

4.6 Abschließender Überblick der Ergebnisse

Insgesamt heben sich Jo1⁺ Patienten in den meisten der untersuchten Merkmale im Grad der Betroffenheit (stärker betroffen) von den beiden anderen Gruppen ab. PL-7⁺ und PL-12⁺ Patienten zeigen allerdings eine im Vergleich zu Jo1⁺ Patienten verstärkte Expression von Th2- und Plasmazellmarkern. PL-7⁺ und PL-12⁺ Patienten ähneln sich zumeist in der Ausprägung der Merkmale. Ausnahmen davon bilden Merkmale wie Fibrose, Gefäßpathologie und Plasmazellinfiltration in den Muskelbiopsien, die in der Gruppe der PL-7⁺ Patienten vergleichsweise häufiger zu finden sind.

Tabelle 14 soll einen generellen Überblick über die wichtigsten Ergebnisse geben:

Tabelle 14 : Die Ergebnisse im Überblick

Die Tabelle soll einen generellen Überblick über die wichtigsten Ergebnisse bieten. Dabei wird die Ausprägung der jeweiligen Befunde, symbolisch mit Pfeilen oder prozentual dargestellt und die Antikörpergruppen untereinander verglichen.

		PL-7	PL-12	Jo1
Klinik	Entzündungsparameter	↑	↑	↑↑↑
	Muskelsymptome	↑	↑↑	↑↑
	Lungenbeteiligung	↑↑	↑↑	↑
Histologie	Myopathie	↑↑	↑	↑↑↑
	Inflammation Makrophage/CD68	↑	↑	↑↑
	Inflammation T Zellen/CD8	↑	-	↑↑↑
	Fibrose	78%	62%	72%
	Gefäßpathologie	↑↑	↑	-
	Plasmazelleninfiltration	↑↑	↑	↑
	B-Zelleninfiltration	↑	↑	↑↑↑
Genmarker	TH1-Marker	<i>IFN-γ, TNFα</i>		↑↑
	TH2-Marker	<i>IL4R, TGFβ, STAT3</i>		-
	Plasmazellmarker	<i>CXCL12</i>		↓
		<i>CXCR4</i>		↑↑↑
		<i>APRIL / BAFF</i>		↑
	B-Zellenmarker	<i>CXCL13</i>		↑↑↑
<i>APRIL / BAFF</i>		↑		
Aktin-aggregate	Myonukleäre Aktineinschlüsse	10%	10%	70%
	Undulierende Tubuli in Gefäßendothelien	40%	40%	30%

5 DISKUSSION

Die entzündlichen Muskelerkrankungen im Kontext des Antisynthetase-Syndroms als Subgruppe der Myositiden zu identifizieren ist in der Praxis sehr wichtig, denn diese Form der Myositis hat eine eigene spezifische Prognose. Dies gilt insbesondere in Bezug auf die Abgrenzung zur Dermatomyositis und zu der unscharf definierten Gruppe der Polymyositis. Ein genaueres Verständnis der Pathogenese und damit eine zuverlässige Diagnose der Erkrankungen ist unabdingbar, um die Therapie zielorientiert und effektiv zu gestalten. In den letzten 43 Jahren ist der Erstklassifikation von Peter und Bohan folgend die Erkenntnis gereift, dass das ASyS nicht zu DM oder PM untergruppiert, sondern als eigenständige Myositisform diagnostiziert werden muss.^{4,5,12} Ganz aktuell wird erforscht, ob, je nachdem welcher Autoantikörper bei dieser Erkrankung auftritt, auch spezifische Merkmale erkenntlich werden, die es zukünftig ermöglichen, das Syndrom in weitere Subgruppen zu untergliedern oder ob es sich um eine weitestgehend homogene Untergruppe handelt. Die Erkenntnisse bisheriger Klassifikationen basierten auf klinischen Daten, laborchemischen Parametern und histologisch und elektronen-mikroskopisch untersuchten Merkmalen der Patienten.³⁸⁻⁴⁵

Durch Auswertung der Daten und eine präzisere Definition der adulten DM ist beispielsweise bei dieser Erkrankung eine Korrelation zu vermehrten Krebsereignissen bei bestimmten Subgruppen (anti-NXP2⁺-, -TIF-1 γ ⁺-Patienten) während des Krankheitsverlaufs festgestellt worden, die eine intensive Untersuchung diesbezüglich im Erwachsenenalter (>40 Jahre) notwendig macht.² Gerade Erkrankungen, die mit schweren Funktionseinschränkungen des Bewegungsapparats, schwerer Beeinträchtigung der Oxygenierung oder mit stärksten Schmerzen einhergehen können und mit einer erhöhten Mortalität verbunden sind, gilt es frühzeitig zu erkennen und möglichst spezifisch zu bekämpfen. Durch intensives Beforschen des SLE, einer Erkrankung, bei der eine Myositis ähnlich der bei ASyS, als Überlappungssymptom auftreten kann, konnte z.B. der Wert des B-Zellaktivierungsfaktor BAFF in der Pathogenese nachgewiesen werden. Aus dieser Erkenntnis konnten anschließend Patienten durch eine Therapie mit Belimumab, einem BAFF-Inhibitor, profitieren.^{107,108} Forschungsarbeiten zur Detektion krankheitsdefinierender Autoantikörper beschleunigen heute die Diagnosestellung des ASyS. Da jedoch nur 2/3 aller Myositispatienten MSA-positiv sind, darf auch die

Unterscheidung der Patienten nach klinischen, histologischen und molekularanalytischen Gesichtspunkten nicht vernachlässigt werden. Dies sollte ein wichtiger Ansatz in dieser Arbeit sein.

Von den acht bei ASyS bekannten Autoantikörpern (anti-Jo1, -PL-7, -PL-12, -EJ, -OJ, -KS, -Tyr und -ZO) wurde bislang an anti-Jo1, dem häufigsten MSA, am ausgiebigsten geforscht. Einige Autoren stellten die Symptome und Symptomkomplexe von Patienten mit Autoantikörpern gegen Jo1 jenen von Patienten, die Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ waren, gegenüber.^{20,38,40,44} Dabei postulierten sie, dass antikörperspezifische Unterschiede bestehen. Neben verschiedenen Forschungsarbeiten, die anhand histologischer Färbungen pathogenetische Vorgänge im Muskelgewebe bei Anti-Jo1⁺ Patienten eindeutig von den Veränderungen, die bei DM-Patienten vorkommen, abgrenzen, gibt es bisher nur einige wenige Studien, die diese distinguierenden Merkmale (v.a. perifaszikuläre Nekrose) auch für Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten mit ASyS bestätigen.^{6,53,54} Ob sich die drei Antikörpergruppen jedoch morphologisch voneinander unterscheiden, wurde bislang nicht nachhaltig untersucht. Zur Aufklärung von Abläufen auf Zellebene, die der Erkrankung ursächlich sind, wurden ineinandergreifende Fehlregulationen des angeborenen und erworbenen Immunsystems aufgedeckt. In der aktuellen Literatur werden, ähnlich wie bei SLE oder RA, Plasmazellnischen vermutet, die von entzündlichem Muskel- oder Lungengewebe ausgehend, die Erkrankung in ihrer Chronizität unterhalten.⁷¹⁻⁷⁸ Den Autoantikörpern selbst wird eine proinflammatorische Effektorfunktion u.a. auf Chemokinrezeptoren zugesprochen.⁹¹⁻⁹⁷ Fehlerhafte NK-Zellen, die sich vor allem in fibrotischem Lungengewebe befinden und zur Pathogenese disponieren, wurden bei ASyS-Patienten gefunden.⁹⁸ Zudem werden ausbleibende Toleranzmechanismen bei der Ätiologie des ASyS als hintergründig gesehen.⁹⁴⁻⁹⁶ Eine Arbeit der letzten Jahre zeigte sehr eindrücklich, dass bei 81% aller untersuchten Anti-Jo1⁺ Patienten Aktinaggregationen in den Myonuklei vorhanden waren.⁵⁴ Dazu passend konnte eine auf Genebene veränderte Regulation von Markern der Aktinpolymerisation und des Aktinshuttlings nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit stellte sich bei der Auswertung der klinischen Daten von 39 Patienten mit ASyS heraus, dass sich Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern von Patienten mit Autoantikörpern gegen PL-7 und PL-12 im symptomatischen Bild unterscheiden. Die Muskelbeteiligung war bei den Anti-Jo1⁺ Patienten verglichen mit

den beiden Vergleichsgruppen mit einem Anteil von 88% zum einen häufiger, zum anderen waren Muskelschwäche und –schmerzen bei diesen Patienten stärker ausgeprägt. Begleitsymptome wie Arthralgien und Mechanikerhände waren öfter bei Anti-Jo1⁺ Patienten zu sehen und ein therapierefraktärer, d.h. schwererer Verlauf wird in dieser Patientengruppe ebenfalls häufiger beobachtet. Die Patienten mit Autoantikörpern gegen PL-7 und PL-12 zeigten häufig begleitend eine Lungenbeteiligung und hatten häufiger Fieber als Anti-Jo1⁺ Patienten.

In allen drei Gruppen konnten die für das Antisynthetase-Syndrom typischen histologischen Merkmale gefunden werden, nämlich die in typischer Lokalisation verteilten nekrotischen und atrophischen Muskelfasern, die besonders in der Peripherie der Faszikel vorkamen, einhergehend mit Anzeichen von Entzündung und Destruktion des perimysialen Bindegewebes. Unterschiede gab es in der Histologie des Muskelgewebes innerhalb der Gruppen allerdings hinsichtlich der quantitativen Ausprägung. Während sich in den meisten Punkten die Skelettmuskelbiopsate von Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten sehr ähnlich präsentierten, waren Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern häufig deutlich schwerer von Entzündung, Atrophie, Nekrosen und entzündlichen Infiltraten betroffen. Die Gefäßpathologie war bei Patienten mit anti-PL-7- und anti-PL-12-Autoantikörpern ausgeprägter, erneut gilt, dass sich beide ähnelten und dadurch von den Anti-Jo1⁺ Patienten abhoben. Gewebsfibrosen allerdings waren bei Anti-PL-7⁺ Patienten am stärksten und bei PL-12 am schwächsten vorhanden. Auf diese, die Akuität der Entzündung illustrierenden Merkmale weist auch die molekulare Analyse mittels quantitativer Messung der Genexpression von Markern, die die spezifische Regulation der Immunantwort widerspiegeln: Während bei Patienten der anti-Jo1-Gruppe eine signifikant erhöhte Genexpression von Interleukinen und Transkriptionsfaktoren gemessen werden konnte, die proinflammatorische Effekte und eine Th1-Differenzierung initiieren (IFN- γ , TNF α , IL-1 β , IL-6, STAT1, CXCR6), waren diese zwar auch in den beiden anderen Gruppen erhöht exprimiert, daneben waren aber ebenfalls Marker für einen eher anti-inflammatorischen und immunregulatorischen Effekt signifikant stärker gegenüber den Skelettmuskelbiopsaten von Anti-Jo1⁺ Patienten exprimiert (TGF β , IL-4R, STAT3, STAT6). Auch die nukleäre Aktinaggregation der betroffenen Myozyten, die als charakteristisch für ASyS gelten, konnten bei anti-Jo1⁺ Patienten regelhaft gefunden werden, während sie in den anderen Gruppen nur zu 10-20% vorhanden waren. Anzeichen für hochregulierte Aktinlevel und Proteine, die die Polymerisation von Aktin

steuern, waren in allen Gruppen vor allem im Zytoplasma zu sehen. Ebenso waren die Transportmoleküle, die den Shuttlingprozess von Aktin aus und in den Nukleus regulieren, verändert exprimiert im Vergleich zu Normalkontrollen. Das unterstützt den Verdacht eines allen Antikörpergruppen gemeinsamen Krankheitsmechanismus jedoch mit unterschiedlich starker Ausprägung. Im entzündlich veränderten Muskelgewebe wurden außerdem spezifisch aktivierte B-Zellen und Plasmazellen identifiziert. Chemokine und deren Rezeptoren, welche die Diapedese von Plasmablasten aus dem Blut in das Knochenmark steuern, wo sie zu langlebigen Plasmazellen werden, konnten in der qPCR des Muskels überexprimiert gemessen werden. Ebenso waren stimulierende Transkriptionsfaktoren (APRIL, BAFF), die eine Entstehung von langlebigen Plasmazellen initiieren, auf Genebene überexprimiert. Dies legt nahe, dass bei der Entstehung des ASyS B-Zellen und Plasmazellen und deren Fähigkeit zur dauerhaften Antikörperproduktion innerhalb der entzündlich veränderten Muskulatur eine pathogenetische Relevanz haben.

5.1 Autoantikörper und klinischer Phänotyp

Die Neigung zu milderer Muskelsymptomatik bei Patienten mit anti-PL-7- und anti-PL-12-Autoantikörpern und das erhöhte Auftreten von ILD bei diesen Patienten, mit einer höheren Prävalenz von Fieber, wurde bereits früher in verschiedenen Studien beobachtet.^{31,39} Die Hypothese eines Autoantikörper-assoziierten klinischen Phänotyps konnte somit auch in der Datenerhebung dieser Arbeit bestätigt werden. In der Jo1-Gruppe war die Muskelbeteiligung ausgeprägter (88%), es gab die meisten Patienten mit ausschließlicher Beteiligung der Muskulatur (19%) und die meisten Patienten mit >30-fach erhöhten CK-Werten (44%). Auch zeigten 37% der Jo1-Gruppe >20-fach zur Norm erhöhte CRP-Werte, was für einen akuten Verlauf der Inflammation mit Muskelgewebsuntergang spricht. Dazu passend waren Muskelbiopsien der Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern, die im „overall-severity-score“, einem Gradmesser für die ‚Schwere‘ der Muskelschädigung (siehe 3.2.4), erhöhte Punktwerte zugeschrieben bekamen, im Vergleich zu den beiden anderen ASyS-Gruppen gehäuft vorhanden. Es wurde zudem deutlich, dass in allen histologischen Myositismerkmalen (Entzündung und Destruktion im Muskelgewebe) außer dem Vorkommen von Fibrose und Gefäßanomalien die Jo1-Kohorte am schwersten betroffen war. Fibrose und reduzierte Kapillardichte, letzteres sogar signifikant im Vergleich zu Anti-Jo1⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten, kamen häufiger bei Anti-PL-7⁺ Patienten vor. In der PL-12-Kohorte waren erweiterte Kapillaren dagegen häufiger als

in den beiden anderen Gruppen. Zu den häufiger vorkommenden Gefäßpathologien passend wurde auch das Raynaud-Syndrom, eine vasogene Anomalie, häufiger bei Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ als bei Anti-Jo1⁺ Patienten identifiziert. 50% der Patienten mit anti-Jo1-Antikörpern hatten Hauterscheinungen, während Anti-PL-7⁺ mit 20% und Anti-PL-12⁺ Patienten mit 38% viel seltener betroffen waren. Entgegen einer Studie aus 2014, die herausfand, dass Mechanikerhände eher bei ASyS mit anti-Jo1-Autoantikörpern vorkamen als bei DM, wofür sie bisher als typisch galten, traten sie bei allen hier untersuchten Patienten nur in ca. 20% der Fälle auf, allerdings immer noch am häufigsten bei Anti-Jo1⁺ Patienten.¹⁰⁹ Der Befund früherer Studien, dass Ro52-Antikörper gehäuft in Korrelation mit anti-Jo1-Autoantikörpern und dem Auftreten von Mechanikerhänden, Arthritis und DM-typischen Hautzeichen verbunden waren, konnte in meinen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Es gab insgesamt nur vier Patienten, die für Ro52 positiv waren und davon war ein Patient gleichzeitig Anti-PL-7⁺, ein anderer Anti-Jo1⁺ und jeweils zwei davon waren Anti-PL-12⁺. Bei nur einem Patienten war gleichzeitig eine ILD diagnostiziert worden, was das Ergebnis einer Studie aus 2017, welche die Korrelation zwischen dem gleichzeitigen Auftreten von anti-PL-7-, anti-Ro52-Autoantikörpern und einer ILD beinhaltete, nicht bestätigt.¹¹⁰ Dies kann eine Folge der geringeren Fallzahl in meiner Studie sein. Zudem wurden die klinischen Daten erst retrospektiv erhoben und bei vielen Patienten war der Antikörperstatus der MAA unbekannt (siehe 3.1.2). Auch konnten in den Gruppen Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten bei ca. 20% der Patienten DM-typische Hautzeichen (Gottron´s Papeln, livides Erythem, Ödeme der Lider, V-sign, shawl-sign) festgestellt werden, die aber nicht bei Ro52-positiven Patienten zu sehen waren. Anti-Jo1⁺ Patienten waren von diesen Hautzeichen mit nur 12% am wenigsten betroffen. Womöglich haben frühere Studien noch keine klare Differenzierung zwischen an DM oder ASyS Erkrankten gemacht und diese dermatologischen Zeichen sind unter Umständen generell untypisch für das ASyS.

Die Arthritis kam in der Jo1-Kohorte mit 50% am häufigsten vor, während in den beiden anderen Gruppen nur 30% der Patienten Gelenkbeschwerden hatten. Dies passt zu den Untersuchungen früherer Studien und bestätigt weiterhin eine der Hypothesen, die dieser Arbeit zugrunde liegt. Von den vier Patienten mit erhöhten Rheumafaktoren hatte nur einer rheumatische Beschwerden. Beide Patienten mit Antikörpern gegen citrullinierte Peptide (anit-CCP) hatten rheumatische Beschwerden, was diesen Antikörper als zuverlässigeren Marker für eine Polyarthritis auszeichnet. Nagashima

et. al/hatten 2009 beobachtet, dass Anti-Jo1⁺ Patienten mit nicht-erosiver Arthropathie und Subluxation der Interphalangealgelenke gehäuft Verläufe präsentierten, die ohne das Auftreten einer Myositis einhergingen. Er schlug vor durch routinemäßige Messung der ARS, zusätzlich zu Anti-CCP-Antikörpern, bei RA diese Patientengruppe zu identifizieren und sie, im Sinne eines „RA-ASyS-overlaps“, als weitere Subgruppe der IIM zu etablieren. In meiner Arbeit gab es nur einen Anti-Jo1⁺ Patienten mit rheumatischen Beschwerden ohne gleichzeitige Myositis. Diagnostisch traf das gemeinsame Vorkommen von anti-CCP und MSA allerdings bei diesem Patienten nicht zu. Trotzdem kann es als diagnostisch sinnvoll betrachtet werden, bei Patienten mit nicht-erosiver Arthropathie und Subluxation der Interphalangealgelenke an ASyS zu denken und eine routinemäßige ARS-Bestimmung sollte dann erwogen werden. Passend zu dem hohen Patientenanteil mit Hautbeteiligung unter den Anti-Jo1⁺ Patienten könnte die hohe Gelenkbeteiligung als weiteres Indiz gesehen werden, die Erkrankung als Überlappungssyndrom mit anderen rheumatoiden Erkrankungen (SSc, SLE, RA) zu charakterisieren.^{4,20,27} Auch bei Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten wurden in der Literatur Überlappungsphänomene wie Raynaud-Syndrom oder Mechanikerhände häufig beschrieben.¹⁶ In meiner Arbeit treten diese Phänomene in beiden Gruppen nur zu ~20% auf. Häufig jedoch treten Überlappungsphänomene zeitlich versetzt (bis zu Jahre) von der Erstmanifestation des ASyS auf. So ist es gut möglich, dass man bei einer erneuten klinischen Untersuchung der Patienten in einigen Jahren, eine weitaus höhere Prozentzahl dieser Symptome finden würde. Tatsächlich waren, wie in diversen Forschungsarbeiten der letzten Jahre mehrfach postuliert, auch in meiner Erhebung die Fallzahlen ILD-Erkrankter in den beiden Non-Jo1-Gruppen mit ca. 50% im Vergleich zu den Jo1-Fällen mit 25% deutlich höher.³⁸ Dasselbe gilt für das Auftreten von Fieber. Im Vergleich dazu konnte die in früheren Arbeiten postulierte Häufung an kardialen Ereignissen bei Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten ebenso wenig bestätigt werden wie eine Häufung gastrointestinaler Beschwerden (z.B. Dysphagie). Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass das ASyS eine Erkrankung mit starker Heterogenität hinsichtlich der nicht skelettmuskulären Symptome ist. Muskelbeteiligung, Lungenbeteiligung und Arthritis sind zwar die häufigsten Symptome, kommen aber häufig isoliert vor. Trotzdem konnte die in den Forschungsarbeiten der letzten Jahre charakteristische Verteilung von Symptomen oder Symptomkomplexen die einzelnen Antikörpersubgruppen betreffend in weiten Teilen bestätigt werden. Bei interstitieller Lungenfibrose könnte es sinnvoll sein, im

Rahmen der Diagnostik trotz fehlender Muskelsymptome einen Antikörpersuchtest auf anti-PL-12 oder anti-PL-7 zu veranlassen. Gleiches gilt für anti-Jo1, wenn Patienten trotz negativer Rheumafaktoren rheumatoide Beschwerden haben. Da in vielen Fällen einem zunächst milden Verlauf mit vereinzelt Symptomen eine Ausweitung dieser einige Jahre später folgt, könnten gezielte Vorsorgeuntersuchungen einen frühzeitigen therapeutischen Eingriff ermöglichen. Neben ASyS sind auch Patienten mit DM häufig von ILD betroffen. Bei DM wurde nach langjähriger Forschung herausgefunden, dass ein Auftreten von anti-MDA5-Antikörpern in ca. 1/3 der Fälle mit einer fatal verlaufenden, prognostisch sehr ungünstigen Variante der Lungenfibrose assoziiert ist, die sich zum Teil unabhängig von den sonst typischen Hautmanifestationen ausprägt.¹¹¹ Eine solche antikörperassoziierte Subgruppe ist auch bei ASyS (insbesondere bei Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten) wahrscheinlich, da auch hier bei einigen Patienten eine schwere, die Prognose wesentlich determinierende ILD auftritt, die dann ebenfalls mit einer sehr viel schlechteren Prognose einhergeht, wie der bei anti-MDA5⁺-Myositis.^{28,31}

5.2 Autoantikörperspezifische Immunaktivierung

Bisher wurden Untersuchungen der histopathologischen Merkmale des Muskelgewebes von ASyS Erkrankten hauptsächlich an Patienten, die positiv auf Autoantikörper gegen Anti-Jo1 getestet wurden, vorgenommen. Dabei konnten Muskelzellnekrosen in der Nähe des perimysialen Bindegewebes- also in der perifaszikulären Region clusternd und die MHC-Klasse-II-Expression auf dem Sarkolemm der Skelettmuskelfasern in gleicher Region, zudem eine perimysiale Fragmentierung des Bindegewebes und nukleäre Aktinaggregate als typisch gegenüber anderen Myositiden erkannt werden.^{6,53} Nur wenige Studien untersuchten bisher, ob diese Merkmale neben Anti-Jo1⁺ Patienten auch als spezifisch für Patienten mit einem der acht weiteren ARS gelten. Typische Muskelfasernekrosen in perifaszikulärer Lage traten bei Suzuki *et. al* auch bei Anti-PL-7⁺ Patienten auf, bei Anti-PL-12⁺ Patienten waren jedoch in den Biopsien keine Muskelfasernekrosen vorhanden.¹¹² Eine Erklärung für das Fehlen der Muskelfasernekrosen bei Patienten mit anti-PL-12-Autoantikörpern könnte sein, dass die PL-12-Gruppe allgemein schwächer von der Myopathie betroffen ist als die beiden anderen Gruppen. Möglicherweise sind in der Gruppe nur gering betroffener Patienten mit anti-PL-12-Autoantikörpern jene Muskelabschnitte mit typischen Anzeichen für ASyS deshalb übersehen worden. Hervier *et. al* und Noguchi *et. al* kamen zu dem Ergebnis, dass die

Frequenz des Auftretens dieser Merkmale sich in den Gruppen Anti-PL-7⁺, Anti-PL-12⁺ und Anti-Jo1⁺ Patienten nicht wesentlich unterschied.^{38,113} Auch in meiner Arbeit wurden perifaszikuläre Nekrose und sarkolemmale MHC-II-Expression in allen drei Patientengruppen gefunden, allerdings gab es antikörperspezifische Unterschiede. In keiner der bisherigen Arbeiten konnten diese Unterschiede im Ausmaß der Myopathie histomorphologisch durch so viele Merkmale zugleich gezeigt werden. Deutlich geringer ausgeprägte Veränderungen der Muskelfasern (‘severity score’) zeigten die Patienten mit anti-PL-12-Autoantikörpern in den Punkten perifaszikuläre Muskelfasernekrose, regenerative Fasern und Fragmentierung des Bindegewebes. In keinem dieser Attribute wurden im Gegensatz zu den anderen beiden Kohorten drei Punkte im semiquantitativen Score vergeben. Auch bezüglich der Hochregulation von MHC-I und -II und dem Ausmaß der Komplementaktivierung wurde in der PL-12-Gruppe am häufigsten der Scorewert 0, d.h. „nicht betroffen“, vergeben. Die Gesamtbetroffenheit, repräsentiert durch den ‘overall severity score’ (1-10 Punkte), zeichnet eine klare Tendenz ab, dass Anti-PL-12⁺ Patienten, die in über der Hälfte der Fälle Scorewerte <5 zeigten, am geringsten betroffen waren, gefolgt von Anti-PL-7⁺ Patienten, die sich sehr ähnlich präsentierten, und im Gegensatz zu Anti-Jo1⁺ Patienten, die in über der Hälfte der Fälle Scorewerte >6 erhielten.

Die Expression und Hochregulation von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II Molekülen wird grundsätzlich durch IFN- γ angeregt, welches hauptsächlich von NK-Zellen des angeborenen Immunsystems und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen nach Antigenprägung produziert wird. Die Genexpression von IFN- γ ist bei allen Patientengruppen signifikant erhöht und auch CD8⁺-Zellinfiltrate sind bei allen Patienten zu sehen, signifikant häufiger als bei Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ ist dies bei Anti-Jo1⁺ Patienten der Fall. Die Muskelfasernekrosen könnten Folge einer MHC-I-vermittelten Zelllyse durch Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen sein oder einer antigenunabhängigen Degranulierung von NK-Zellen. Auch die durch C5b-9 detektierte Komplementaktivierung sarkolemmal in perifaszikulärer Lage war in der Jo1-Gruppe besonders ausgeprägt. Diese unspezifische Immunreaktion ist durch Aktivierung von Caspasen zur Initiation des MAC (membran attack complex) befähigt, welcher ebenso zur Zelllyse und Nekrose führt. Da bei allen Kohorten Komplement nachgewiesen wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass eine dahingehende Pathogenese eine Rolle bei den AsyS Myositiden spielt. Weiterhin, weiß man, dass Komplement chemotaktisch auf Immunzellen wirkt und im entzündlichen Infiltrat IFN- γ und TNF α ausgeschüttet wird,

welches ebenfalls in allen drei Gruppen auf Genebene signifikant hochreguliert gemessen wurde. In allen untersuchten Biopsien sind Leukozyteninfiltrate zu sehen. Das entzündliche Infiltrat wurde zunächst durch den Panleukozytenmarker CD45 detektiert, war aber auch in den Färbungen der spezifischen Zellen, wie Makrophagen, T-Helfer- und B- sowie Plasmazellen ähnlich den zytotoxischen T-Zellen in der Jo1-Kohorte dichter und weiter verbreitet in der Muskulatur vorzufinden. Neben dem proinflammatorischen Marker $IFN-\gamma$ ist auch $TNF\alpha$ signifikant in allen Gruppen erhöht und sorgt mit dem ebenfalls hochregulierten Chemokin CXCR6 für die Anlockung und Aktivierung von Th1-Helferzellen im entzündeten Gewebe. $IFN-\gamma$ sorgt für eine Aktivierung von Makrophagen, was sich in der qPCR-Analyse bei allen Patienten in einem teils signifikant vermehrten Genprodukt an proinflammatorischen Zytokinen wie *IL6* und *IL1B* widerspiegelt. Dies erklärt die ausgeprägten Infiltrate und scheint ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Myositis zu sein. Da bei Anti-Jo1⁺ Patienten die häufigsten Myophagozytosen, sowie die größte Zahl an CD8⁺-Zellen vorkommen, gepaart mit der am stärksten ausgeprägten Pathologie in der Histologie, ist ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad des ASyS und der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen wahrscheinlich. Auch ist bekannt, dass $IFN-\gamma$ und $TNF\alpha$ an der Muskelregeneration und Myogenese nach Zellschädigung beteiligt sind. Über den STAT1-Signalweg, ein Transkriptionsfaktor, der auch in allen drei Gruppen erhöhte Genexpressionsmuster zeigt, wird die Differenzierung neuer Muskelzellen angeregt, was die histo-morphologischen Ergebnisse bezüglich zahlreicher regenerierender Fasern erklärt.¹¹⁴

Wie oben bereits erwähnt waren Anti-PL-12⁺ Patienten und auch Anti-PL-7⁺ Patienten von der näher beschriebenen Gefäßpathologie vermehrt betroffen, verglichen mit Anti-Jo1⁺ Patienten. In Kombination mit vermehrt auftretendem Raynaud-Syndrom könnte eine prominente mikrovaskuläre Pathogenese unterstellt werden. Dies wird auch durch die Häufung des Nachweises undulierender Tubuli in Gefäßwandepithelien auf EM-Aufnahmen untermauert (**Abbildung 21**). Undulierende Tubuli gelten als ER-/Zellstressvermittelte Phänomene in kapillären Endothelien.¹¹⁵ Da in den Gruppen der Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten die muskuläre Expression von den antientzündlich wirkenden Molekülen *TGFB*, *IL4R*, *STAT3* und bei Anti-PL-7⁺ *STAT6* im Vergleich zu Anti-Jo1⁺ Patienten signifikant erhöht ist, kann davon ausgegangen werden, dass ein alternativer inflammationstypischer Aktivierungszustand der Makrophagen und T-Zellen vorliegt, welcher eher milde chronische Verläufe induziert.

Dass sich histomorphologisch und auf molekularer Ebene so viele Gemeinsamkeiten finden lassen, spricht gegen einen gänzlich unterschiedlichen Pathomechanismus. Zudem fällt in den Gruppen Anti-PL-12⁺ und Anti-PL-7⁺ eine starke Übereinstimmung des klinischen Phänotyps und der veränderten Genexpression im Muskelgewebe auf, was an einen sehr ähnlichen Pathomechanismus in diesen beiden Gruppen denken lässt. Eine Begründung für den milderen chronischen Krankheitsverlauf, könnte also eine dazu passende alternative und eher „antiinflammatorische“ Immunreaktion in diesen Gruppen sein. Im Verlauf einer Entzündung, besonders, wenn sie chronisch verläuft, kann TGFβ zur Entstehung von Fibrose und Atrophie führen, Regeneration wird durch TGFβ verhindert. Auf der anderen Seite spielt TGFβ eine wichtige Rolle beim Abheilen der Verletzung im Langzeitverlauf.¹¹⁶ In Akutphasen ausgeschüttetes TGFβ führt zu kompletter Abheilung, während chronisch erhöhte Werte zu unvollkommener Abheilung, vermehrten Schmerzen, verminderter Perfusion und Fibrosierung im Gewebe führen.¹¹⁶ Neben der Induktion eines chronischen Verlaufs mit Entstehung von Narbengewebe ist TGFβ dazu fähig, Makrophagen zur Differenzierung in M2-Richtung zu stimulieren. Diese können dann die im Gewebe entstandene Beschädigung phagozytisch beseitigen. Durch die Überexpression von IFN-γ bei Anti-Jo-1⁺ Patienten, sowie durch das signifikant erhöhte Vorkommen von CD8⁺-Zellinfiltraten, gepaart mit einem schwereren, klinisch akuterem Verlauf kann diese Kohorte hier erneut den beiden anderen Patientengruppen gegenübergestellt werden. Die Untersuchungsergebnisse lassen einen Mechanismus in dem zytotoxische T-Zellen für die Muskelpathologie der Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern verantwortlich sind vermuten. In den beiden anderen Gruppen, der Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten hingegen sprechen die Ergebnisse eher für einen „alternativen“ immunologischen Aktivierungsweg. Dieser scheint primär mit einem M2-Makrophagenphänotyp zu korrelieren, der über eine *TGFB*- und *STAT6*-Hochregulation einen milderen Verlauf, mit weniger Inflammation und Atrophie, in den Muskelbiopsien bedingt.

5.3 Die Rolle langlebiger Plasmazellen

Zu den Hypothesen der Vergangenheit zählt die Vermutung, dass NK und CD8⁺-Zellen Granzym B sezernieren, welches proteolytisch, untypische Spaltprodukte der tRNA-Synthetasen generiert und damit die Selbsttoleranz der Zellen des angeborenen Immunsystems überwindet. Ein relativ neuer Ansatz, ist es, den B-Zellen und

Plasmazellen eine pathogenetische Funktion bei der Genese des ASyS zuzuordnen.^{94,95} Es wird angenommen, dass bei der Reaktivierung einer B-Gedächtniszelle zur kurzlebigen Plasmazelle durch ihr spezifisches Antigen antiapoptotische Aktivatoren die Entstehung von Plasmablasten bewirken. Plasmablasten haben die Fähigkeit, Antikörper zu produzieren, durch die Blutbahn zu wandern und sich, wenn in bestimmten Geweben Chemokinliganden (CXCL12) exprimiert werden, dort als nicht mehr migrationsfähige, aber langlebige antikörperproduzierende Plasmazellen dauerhaft niederzulassen („homing“).⁷⁷ Normalerweise wird CXCL12 hauptsächlich von Stromazellen des Knochenmarks exprimiert, wo nach dem „homing“ eine sog. „Überlebensnische“ der langlebigen Plasmazellen im Sinne eines Immungedächtnisses entsteht. Bei RA wurde z.B. die Gelenkkapsel, bei SLE die Niere als eine solche Überlebensnische identifiziert. Die Hypothese, dass dauerhaft gebildete Autoantikörper im Verdacht stehen, die Erkrankung von dort aus aufrechtzuerhalten stellt ein attraktives pathogenetisches Konzept dar, welches ich genauer untersucht habe.^{86,117} In meiner Arbeit konnte ich zunächst feststellen, dass in allen Patientengruppen muskuläre Infiltrate sowohl von B-Zellen (CD20⁺) als auch von Plasmazellen (CD138⁺) zu finden waren. Verglichen mit Anti-PL-12⁺ Patienten waren die B-Zellinfiltrate bei Anti-Jo1⁺ Patienten signifikant stärker ausgeprägt und auch die PL-7-Gruppe war, ähnlich zu PL-12, weniger stark als die Jo1-Gruppe betroffen. Bezogen auf die Genexpression konnte weiterhin festgestellt werden, dass der Chemokinligand (CXCL13), der eine Diapedese der B-Zellen in das entzündliche Gewebe stimuliert, in der Jo1-Gruppe signifikant vermehrt im Vergleich zu den Normalkontrollen vorhanden war. Bei den Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten war die Expression ebenfalls hochreguliert, allerdings ohne Signifikanz zu erlangen. Studien hatten gezeigt, dass der B-Zellaktivator BAFF mit der Höhe des CK-Werts und dem Grad der Krankheitsaktivität einhergeht.⁸⁷ Die vermehrten B-Zellinfiltrate und die gleichzeitig stark erhöhten CK-Werte entsprechen dieser Beobachtung. Die B-Plasmazellaktivatoren BAFF und APRIL wurden in allen drei Gruppen in etwa gleichmäßig, den Normalkontrollen gegenüber aber vermehrt gebildet. Eine B-Zellbeteiligung an der Krankheitsentstehung und –aktivität liegt daher nahe. Es ist bekannt, dass die BAFF-Ausschüttung durch IFN- γ stimuliert wird, welches wiederum von Th1 Zellen nach Antigen Stimulation gebildet wird. Weiterhin weiß man, dass BAFF eine Differenzierung von B-Gedächtniszellen zu antikörperbildenden Plasmazellen stimuliert.^{106,107} 85% der hier untersuchten Patienten zeigten zahlreiche

Plasmazellinfiltrate. Die in der Immunhistochemie dargestellten Infiltrate der CD138⁺-Zellen waren in den Patientenkohorten gleich stark vorhanden, dies korreliert mit den in der qPCR-Analyse erhöht gemessenen Markern an BAFF und IFN- γ . Letzterer war sogar in allen Gruppen signifikant erhöht. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer allen Patientengruppen gemeinsamen B-Zell-induzierten Entstehung von Plasmazellen, die in der entzündeten Muskulatur für eine Autoantikörperbildung sorgen und auch die Persistenz von langlebigen Plasma-Zellen begünstigen.

Plasmazellen benötigen, um langjährig in ihrer Nische zu überleben, sogenannte Überlebenssignale. Diese sind die Zytokine IL-6, TNF α , welche bei allen von mir untersuchten Patientenproben (Skelettmuskeln) auf Genebene signifikant erhöht exprimiert wurden. Weitere solche Überlebenssignale sind CXCL12, BAFF sowie APRIL. Plasmazellen sind gewöhnlich nicht im Muskelgewebe zu finden. Entzündetes Gewebe kann aber im Sinne einer lokalen Bekämpfung einer Infektion zur Überlebensnische werden. Die Existenz von Plasmazellen im Muskel bei Myositis geht mit dem Verdacht einher, dass durch lokale Zytokinproduktion Plasmablasten in den Muskel gelockt werden, die dort zu langlebigen Plasmazellen ausreifen und durch Antikörperproduktion die Nische dauerhaft befeuern. Für anti-Jo1-Autoantikörper wurde entdeckt, dass sie die IFN- γ Ausschüttung aus dendritischen Zellen stimulieren.¹¹⁷ Autoreaktive B-Gedächtniszellen werden reaktiviert und bilden neue autoantikörpersezernierende Plasmablasten, die wiederum in andere Überlebensnischen migrieren könnten. Langlebige Plasmazellen, die in Phasen der Remission befähigt sind, kontinuierlich Autoantikörper zu bilden, könnten daher, sobald die IFN- γ -Ausschüttung eine B-Gedächtniszellreaktivierung initiiert, einen neuen Schub auslösen. IFN- γ stimuliert die Bildung von CXCL12 in entzündetem Gewebe, wodurch das „homing“ für weitere langlebige Plasmazellen in die Entzündungsnischen erleichtert wird. Es wird angenommen, dass jedes Mal, wenn neue langlebige Plasmazellen entstehen und migrieren, der Pool an langlebigen Plasmazellen in vorbestehenden Überlebensnischen durch diese ersetzt wird.¹¹⁸ Dadurch würde es im Verlauf immer mehr autoreaktive Plasmazellen geben, die sich selbst stimulierend, den üblichen Therapeutika (Steroide, DMARDs) unzugänglich wären. Entweder den „homing“-Prozess zum Beispiel durch Chemokinrezeptorantikörper oder die Wirkung von Überlebenssignalen (IL-6-Blockade, BAFF-Blockade) zu verhindern wäre daher eine Möglichkeit, die Erkrankung dauerhaft und spezifischer zu adressieren.

CXCL12 und die Rezeptoren CCR7 und CXCR4 spielen eine wichtige Rolle im „homing“-Prozess von Plasmablasten aber auch von T-Gedächtnis-Zellen.^{119,120} In der qPCR gemessen, zeigte sich *CXCR4* in allen Gruppen signifikant erhöht und *CCR7* erhöht exprimiert. *CXCL12* war nur bei Anti-PL-7⁺ Patienten erhöht exprimiert, signifikant unterschiedlich zu Anti-Jo1⁺ Patienten. In der PL-7-Gruppe waren auch die meisten CD138⁺-Zellen, wenn auch nur tendenziell, identifiziert worden. Ob die erhöhten Chemokinmarker ein Plasmazell- oder T-Zell-„homing“ widerspiegeln, versuchte ich in einem weiteren Schritt meiner Arbeit zu klären. In den immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen CXCR4, CXCL12 und CXCL13 konnten die Oberflächenmoleküle auf Immunzellen aller drei Gruppen sichtbar gemacht werden (**Abbildung 18**). Da nur Plasmablasten im „homing“-Prozess nicht aber die langlebigen Plasmazellen nach Verlust der Migrationsfähigkeit in der Entzündungsnische CXCR4 exprimieren (nach der Differenzierung exprimieren sie CXCR3), würde der gleichzeitige Nachweis der Oberflächenmoleküle CD138 und CXCR4 auf einer Zelle die Hypothese des „homings“ von Plasmablasten in betroffenem Muskelgewebe bestätigen. Um dies nachzuweisen, modifizierten wir mehrmals die Färbeprotokolle. Trotz mehrfachen Anpassens der Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten gelang uns der eindeutige Nachweis einer Kolo-kalisation in der Immunfluoreszenz jedoch nicht, was den komplexen und noch wenig etablierten Umgang mit aktuell erhältlichen Chemokinmarkern in der Immunfluoreszenz widerspiegelt (siehe 5.4).

In den von mir angefertigten Färbungen zeigte sich allerdings sowohl eine Kolo-kalisation von den Oberflächenmolekülen CD20 und CXCL12 als auch CD68 und CXCL12 (**Abbildung 19**). Es könnte also sein, dass B-Zellen und Makrophagen, stimuliert durch Zytokine wie z.B. IFN- γ den Chemokinliganden exprimieren, um in einem weiteren Schritt Plasmablasten in das Muskelgewebe zu rekrutieren. Auch den Liganden CXCL13 konnte ich in den Immunfluoreszenzfärbungen auf der Oberfläche von B-Zellen und Makrophagen nachweisen, was diese Überlegung bestärkt (**Abbildung 20**). Es wurden zum Beispiel in der Speicheldrüse von Patienten mit Morbus Sjögren langlebige Plasmazellen in der Nähe von CXCL12 produzierenden Mukosazellen gefunden.¹²¹ CXCL12 konnte zwar nicht neben dem Oberflächenmarker CD4 kolo-kalisiert werden, **Abbildung 19 A** zeigt jedoch eindrücklich, eine hohe CXCL12-Konzentration in der Umgebung von T-Helferzellen (CD4⁺). Dies könnte entweder ein Indiz dafür sein, dass T-Zellen „Lockstoffe“ ausschütten, um die Arbeit

der B-Zellen und Makrophagen zu unterstützen oder, dass sie selbst dem Konzentrationsgradienten von CXCL12 in das Gewebe folgen. Vermutlich, jedenfalls spielt auch eine T-Zell-abhängige Stimulation, bei der Entwicklung autoantikörperbildender Plasmazellen eine Rolle. Im Muskelgewebe von Patienten mit DM wurde das „homing“ von T-Zellen über CXCR4/CXCL12-Interaktion bereits beschrieben.¹¹⁹ Die Erkenntnis, dass neben der Einwanderung von B- und T-Zellen in den Muskel, auch das Plasmazell „homing“ eine pathogenetische Rolle spielen könnte, macht zukünftige, diesen Prozess inhibierende, Therapieoptionen für die ASyS-assoziierte Myositisformen denkbar. Es wurde außerdem gezeigt, dass CXCL12 an verstärkter Aktinpolymerisation beteiligt ist.¹²² Da erwiesenermaßen die veränderte Aktinbündelung bei ASyS eine Rolle spielt könnte die verstärkte CXCL12 Expression auch in diesem Zusammenhang gesehen werden. Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird hauptsächlich von Plasmablasten exprimiert, um in das Knochenmark zu migrieren, ist aber durchaus auch für das „homing“ via CXCL12 in verschiedene andere Gewebe bekannt.⁷⁶ In der Immunfluoreszenz wurde eine CXCR4 Expression auf CD138⁺-Zellen und wie diese Zellen an CXCL12 Liganden binden bisher noch nicht gezeigt. Progenitorzellen des Muskels werden über CXCR4/CXCL12-Interaktion in verletztes Muskelgewebe gelockt. Neben Knochenmark und dem ZNS war auch für Muskelgewebe nachgewiesen worden, dass während der Embryonalperiode, aber auch später, z.B. bei Gewebsverletzung und Zellstress entlang der CXCL12/CXCR4-Achse Stammzellen in diese Gewebe rekrutiert wurden.^{122,123} Entlang eines CXCL12-Konzentrationsgradienten werden so Satellitenzellen mit CXCR4-Rezeptorbesatz zu beschädigten Muskelarealen gelockt, um dort zu Myotuben auszdifferenzieren. Es ist also gut möglich, dass so auch andere Immunzellen von der betroffenen Muskulatur angezogen werden. Denkbar wäre, dass die vermehrte Ausschüttung von CXCL12 im Muskel, die gleichzeitig die B-Zelldifferenzierung stimuliert, einen ersten Schritt in der Pathogenese des ASyS darstellt. Granzym-B sezernierende NK- bzw. CD8⁺-Zellen, könnten dann über atypisch gespaltene tRNA-Synthetasen zu Toleranzverlust gegen autologe Muskelfasern führen, der daraufhin eine Autoantikörperentstehung provoziert.

B-Zellen stimulieren unter CXCL12-, APRIL- und BAFF-Überexpression (welche in jeder der hier untersuchten Patientengruppen nachgewiesen wurde) den Rezeptor-switch von CXCR4 zu CXCR3 auf Plasmablasten, außerdem unterstützen sie die Entwicklung neuer Plasmablasten.⁷⁵ Es wäre sinnvoll in Zukunft die CXCR3-

Expression auf Plasmablasten und die CXCL9/10/11-Expression im Muskelgewebe bei ASyS zu untersuchen. Bei RA und SLE wurde das „homing“ von Plasmablasten in das Entzündungsgewebe über diesen Weg beschrieben.^{124,125}

5.4 Autoantikörperspezifische Unterschiede myonukleärer Aktinaggregation

EM-Aufnahmen der drei Patientengruppen zeigen, dass bei Anti-Jo1⁺ Patienten viel häufiger als bei Anti-PL-7⁺ oder Anti-PL-12⁺ Patienten intranukleäre Aktineinschlüsse in Myonuklei in den Biopsaten (70% vs. 10%) zu identifizieren waren, während undulierende Tubuli in Gefäßendothelien bei Anti-PL-7⁺ oder Anti-PL-12⁺ Patienten etwas häufiger vorkamen als bei Anti-Jo1⁺ Patienten (40% vs. 30%).

Im Vergleich zu der Arbeit von 2015 über nukleäre Aktinaggregate aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte hier in der qPCR nur in der Jo1-Kohorte eine eindeutige Hochregulation der Gene für Aktin im Nukleus festgestellt werden.⁵⁴ Da in den EM-Bildern aber auch Patienten der PL-12- und PL-7-Gruppe Aktineinschlüsse im Nukleus zeigen, liegt es nahe, dass das Merkmal auch in diesen Fällen auftritt, die Ausprägung dort aber etwas schwächer ist. Die stark vermehrt gemessenen mRNA-Werte von Aktin und an der Aktinpolymerisation beteiligter Proteine bestärkten diese Annahme. Auch die verändert regulierten Transportproteine und ihre Kofaktoren deuten auf eine Fehlfunktion hinsichtlich des Aktinshuttlings hin. Es wurde bereits postuliert, dass Fehler in der nukleären Aktinfilamentbildung zur Aggregatbildung und in einem zweiten Schritt im Muskel zu Muskelschwäche führen kann.⁶⁶ Außerdem wurde mehrfach bestätigt, dass die Aktinfilamentbildung und das „shuttling“ von Aktin in den Nukleus gerade bei Zellstress und Entzündungsvorgängen durch die Ausschüttung von ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) angeregt werden.^{55,56,66} Eine weitere Studie spricht von fehlregulierter T-Zellaktivierung bei oxidativ veränderten „shuttling“-Proteinen.^{57,58,59,61} Inwieweit dieser Zusammenhang bei ASyS eine Rolle spielt und welchem genauen Pathomechanismus die Aktinbündel im Kern der Muskelzellen unterliegen, muss zum genauen Verständnis in zukünftigen Arbeiten weiter erforscht werden. Klar ist aber, dass nukleäre Aktinaggregate bei allen bisher darauf untersuchten Antikörper-subgruppen des ASyS vorhanden waren, was für ein diese Erkrankung charakterisierendes Merkmal spricht. Somit kann die Empfehlung ultrastruktureller Analysen von Muskelgewebe zur Diagnose eines ASyS als valide Methode bestätigt werden.

5.5 Fazit und Ausblick

Verglichen wurden die klinischen, laborchemischen und epidemiologischen Charakteristika von 39 Patienten mit ASyS die für einen der drei ARS Anti-PL-7, -PL-12 oder -Jo1 positiv getestet wurden. Von 33 dieser Patienten wurden Skelettmuskelbiopsien entnommen und ausführlich morphologisch und molekulargenetisch untersucht. Dies geschah mittels konventionell histologischen/enzymhistochemischen und immun-histochemischen Färbungen, ultrastrukturellen Untersuchungen sowie der molekularen Analyse der Expression von Zytokinen und Chemokinen, die in der Immunaktivierung eine Rolle spielen per PCR.

Augenscheinlich wurde dabei, dass Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern einen klinisch schwerwiegenderen Verlauf präsentieren und dass sich anti-PL-12⁺ sowie anti-PL-7⁺ Patienten im klinischen, histomorphologischen und molekulargenetischen Phänotyp stark ähneln. Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern zeigten signifikant häufiger CD8-Zellinfiltrate in den Skelettmuskelbiopsien, dazu korrespondierend waren proinflammatorische Zytokine (z.B. IFN- γ , TNF α , IL-6, IL1 β , STAT1) signifikant überexprimiert. Patienten mit Autoantikörpern gegen PL-12 und PL-7 zeigten neben der signifikanten Überexpression von antiinflammatorischen Zytokinen (TGF β , IL-4R, STAT6) vermehrt Fibrose in den Muskelbiopsien. Ein Hauptergebnis der aktuellen Studie war der formale Nachweis von B-Zell- und Plasmazellclustern in den Muskelbiopsien vieler Patienten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Zellen in einem charakteristischen Chemokinmilieu aktiv sind, was eine Schlüsselrolle von langlebigen Plasmazellen als dauerhafte Autoantikörperproduzenten in der Pathogenese des ASyS wahrscheinlich macht. Dieser Plasmazell-Phänotyp scheint demnach die Muskulatur als ‚ektoper‘ Überlebensnische zu nutzen.

Meine Hypothesen unterstützend konnte ich zeigen, dass sich der klinische Phänotyp der Patientengruppen mit anti-PL-7- und anti-PL-12-Autoantikörpern stark ähnelt. Die Myositis oft von arthritischen Beschwerden begleitet, stand bei den von mir untersuchten Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern im Vordergrund. Davon hoben sich die Vergleichsgruppen der anti-PL-7⁺ und anti-PL-12⁺ Patienten ab, die beide neben der Myositis, als häufigste Begleitsymptome ILD und Fieber zeigten. Ähnliche Ergebnisse waren schon in früheren Studien identifiziert worden, aufgrund der geringen Patientenzahl gelang es in meiner Arbeit jedoch nicht, weitere signifikante Merkmale zu finden, welche die Patientengruppen voneinander abgrenzen. Ein weiterer limitierender Faktor meiner Datenevaluation war die retrospektive

Herangehensweise der Studie. Eine vergleichende Untersuchung zwischen klinischer Ausprägung (Laborwerterhöhung, Dauer der Erkrankung, schwere der Muskelsymptome und Begleitsymptomatik), histologischen Befunden und molekulargenetischer Analyse einzelner Patienten war aufgrund des dünnen Datenspektrums nicht sinnvoll möglich (siehe 3.1.2). Gleiches gilt für statistische Erhebungen bezüglich der klinischen Parameter. Für viele Patienten und alle NDC waren die Laborwerte, wie CRP und CK, entweder unbekannt oder als normwertig ohne konkreten Zahlenwert übermittelt. Von der fiktiven Festlegung eines Wertes im Normbereich zum Zwecke der statistischen Datenerhebung wurde abgesehen. Vergleiche innerhalb der Autoantikörpergruppen ergaben wegen der geringen Fallzahlen keine Signifikanz (siehe 3.1.2).

Viele der eingeschlossenen Patienten waren bereits vor mehreren Jahren behandelt worden und eine Ergänzung der fehlenden Informationen aufgrund des Zeitabstandes nicht mehr vollumfänglich möglich. Dies ist nicht zuletzt der niedrigen Inzidenz der Erkrankung im Allgemeinen geschuldet. Daher wäre es für zukünftige Erhebungen sicher sinnvoll, an den jetzigen Ergebnissen orientierte, spezifische Fragebögen zu entwickeln, um zielgerichteter und prospektiv neue Erkenntnisse zu generieren.

Die molekulare Basis des ASyS ist weitestgehend unbekannt. Eigene frühere Studien, die auch von anderen bestätigt wurden haben eindeutig bewiesen, dass sich die Muskelpathologie bei ASyS zwar von der bei DM unterscheidet, Vergleiche zwischen den einzelnen Antikörpergruppen und größer angelegte Untersuchungen zur gezielten Pathogenese stehen aber bisher aus. Meine Arbeit hatte damit das Ziel, das Wissen im Bereich des ASyS zu erweitern und eine detailliertere Analyse von Patienten mit unterschiedlichen Autoantikörpern für diese Entität zu schaffen. In meiner Arbeit konnte ich sowohl mittels histologischer Färbungen als auch in der molekularen Analyse zeigen, dass sich Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern in ihrer Pathologie von Patienten mit anti-PL-7- und anti-PL-12-Autoantikörpern abgrenzen. Charakteristisch für Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern waren unter anderem CD8⁺ Zellinfiltrate und dazu passend eine signifikante Überexpression proinflammatorischer Zytokine, u.a. von IFN- γ und IL-6, gepaart mit einem klinisch schweren Verlauf. Anti-PL-7⁺ und Anti-PL-12⁺ Patienten zeigten in den Muskelbiopsaten vermehrt Fibrose und signifikant überexprimierte Zytokine, die bei chronisch fibrosierenden Immunvorgängen ausgeschüttet werden wie beispielsweise IL-4 und TGF β . Diese Ergebnisse passen gut zu einer alternativen Immunaktivierung

bei Patienten mit anti-PL7- und anti-PL-12-Autoantikörpern, die ja auch tatsächlich deutlich mehr fibrosierende und deutlich weniger akut nekrotisierende Veränderungen in der Skelettmuskulatur zeigten. Andererseits spielt offenbar ein überwiegend zytotoxischer, CD8-Zell-mediiertes Prozess bei Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern eine Rolle, wobei aber auch eine MHC-Klasse-II-restringierte CD4-mediierte, Immunität mit IFN- γ Produktion nachzuweisen war. Im Vergleich der morphologischen Merkmale war oft eine Tendenz zu verschiedenen Ausprägungen in den einzelnen Subgruppen zu erkennen. Jedoch war auch hier die Gruppenstärke ein limitierender Faktor und für eine klare signifikante Aussage wäre auch die Untersuchung umfangreicher klinischer und histomorphologischer Parameter auch prospektiv in einer größeren Kohorte notwendig.

Eine Methode, die in den bisher publizierten Untersuchungen zu ASyS nicht verwendet wurde, ist die Färbung von Chemokinen in Muskelbiopsaten. Die Etablierung der Chemokinfärbungen stellte sich (aufgrund der Natur der Chemokine und der Qualität kommerziell erhältlicher Antikörper) als schwierig heraus, so dass nicht alle Färbungen im Rahmen meiner Arbeit final etabliert werden konnten. Nichtsdestotrotz gelang es mir eindrucklich, die Expression von relevanten Rezeptoren und Chemokinen in Plasmazellen, B-Zellen und T-Zellen zu demonstrieren. Auf molekularer Ebene konnte ich zunächst höhere Werte an plasmazellregulierenden Genen messen. Die Aktivatoren APRIL und BAFF waren z.B. in allen Gruppen erhöht nachzuweisen. Außerdem war der Chemokinrezeptor CXCR4, der für die Einwanderung von Plasmazellen in entzündetes Gewebe entscheidend ist, in allen drei Gruppen signifikant erhöht exprimiert. Auch das Vorkommen von Plasmazellclustern konnte ich in den immunhistochemischen Färbungen bei allen Patientengruppen nachweisen. Auch konnte ich in der POD-Färbung der Muskelproben Cluster von Zellen identifizieren, die Chemokinrezeptoren und -liganden (CXCR4, CXCL12, CXCL13) auf der Zelloberfläche exprimierten. Diese Chemokine sind, wie in **Tabelle 13** erläutert, für die Migration von Immunzellen in entzündetes Gewebe bedeutend. Es gelang auch durch Immunfluoreszenzdoppelfärbung zu beweisen, dass B-Zellen in den pathologisch veränderten Muskelbiopsien der Patienten mit ASyS den Liganden CXCL12 exprimieren. Ebenfalls konnte ich zeigen, dass Makrophagen diese Lockstoffe bilden, da in der Immunfluoreszenz farblich markierte CD68⁺-Zellen ebenfalls CXCL12 und CXCL13 exprimierten, was P- und B-Zellen zur Diapedese anregt. Auch konnte ich visualisieren, dass T-Zellen vermutlich über den Rezeptor

CXCR4 diesem Signal folgend ins Gewebe migrieren, da in der Immunfluoreszenz eine klare Doppelfärbung von CD4⁺-Zellen, dem CXCR4 Rezeptor sowie CXCL12 zu sehen war. Die Arbeit mit Chemokinen in der Immunfluoreszenzfärbung ist zwar eine Herausforderung, jedoch insgesamt sehr eindrücklich gelungen. Die Hypothese langlebiger Plasmazellen, die im Muskel von Patienten mit ASyS die Autoantikörperbildung dauerhaft aufrechterhalten, konnte ich ebenfalls indirekt belegen. Dies gelang durch den Nachweis von Plasmazellen im Muskelgewebe der Patienten, die molekulare Hochregulierung von Plasmazellaktivatoren bei diesen Patienten und den Nachweis von für die Plasmazellmigration üblichen Chemokinen in den Muskelbiopsien, sowohl auf immunhistochemischer als auch auf molekularer Ebene. Aufgrund der erwähnten technischen Schwierigkeiten die Färbeprotokolle betreffend, steht die Veranschaulichung des sogenannten „homing“-Prozesses für CD138⁺ Plasmazellen in der Doppelfärbung noch aus. CD138⁺ Plasmazellen und deren Vorstufen mit relevanten Chemokinen (CXCR4, CXCL3, CXCL12) in der Doppelfärbung zu zeigen, wäre ein wichtiger Aspekt für die Fortführung dieses Forschungsprojektes.

Bedeutend ist die klinische Relevanz die der Nachweis der oben beschriebenen „Plasmazellnischen“ in pathologisch veränderter Muskulatur von Patienten mit ASyS hat. Unsere Daten können als molekulare Basis dienen, den Einsatz plasmazellinhibierender Substanzen (IL-6-Blockade, BAFF-Blockade), sowie Hemmstoffen der Plasmazellaktivierung wie z.B. Atacicept therapeutisch bei ASyS zu erproben. Ebenso könnte die Stammzelltransplantation eine dauerhafte Heilungschance für Patienten mit ASyS bedeuten, zumindest in therapierefraktären und chronischen/rezidivierenden Verläufen.

Die weitergehende Forschung an langlebigen Plasmazellen bei ASyS wäre darüber hinaus nicht nur für diese Patienten entscheidend. Betrachtet man die Ähnlichkeit des klinischen Phänotyps zur Myositis bei anderen Überlappungssyndromen wie SLE, SSc oder RA könnte auch diesen Patienten durch neue Erkenntnisse geholfen werden. Plasmazellen werden außerdem im Zusammenhang mit z.B. SLE bereit sehr intensiv untersucht, daher sind überlappende und sich ergänzende Forschungsergebnisse zu erwarten.

Zusammenfassend gelang es mir in dieser Arbeit den vielfach eher fulminanten Krankheitsverlauf bei Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern molekular genauer zu charakterisieren und eine gemeinsame Basis für die morphologischen Gegebenheiten

zu schaffen, was auch unsere früheren Ergebnisse bestätigt und untermauert. Interessanterweise zeigte sich ein ähnliches klinisches und histologisches Bild, sowie eine ähnliche molekulargenetische Aktivierung im Skelettmuskulgewebe bei anti-PL-7⁺ und anti-PL-12⁺ Patienten. Es gelang mir außerdem neue Aspekte die Immunaktivierung betreffend aufzuzeigen. Interessant ist dabei der vermutlich eher CD8-Zell-induzierte, proinflammatorisch betonte Immunmechanismus bei Patienten mit anti-Jo1-Autoantikörpern mit akutem Verlauf. Dem steht eine, eher ins chronisch regenerativ weisende, alternative Immunaktivierung bei Patienten mit anti-PL-7- und anti-PL-12-Autoantikörpern gegenüber. Eine weitere sehr relevante neue Erkenntnis ist auch die Expression von Chemokinen, die in der Diapedese von Plasmazellen und B-Zellen eine Rolle spielen, sowie Cluster dieser Zelltypen in den Muskelbiopsien von Patienten mit ASyS. Dieses Ergebnis kann weitreichende Implikationen für Therapiekonzepte für chronisch rezidivierende Verläufe und auf ‚Standardtherapie‘ refraktäre Patienten haben, bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Wiendl H. Myositissyndrome. 2015a;(September 2014):1-19.
2. Hida A, Yamashita T, Hosono Y, Inoue M, Kaida K, Kadoya M, Miwa Y, Yajima N, Maezawa R, Arai S, Kurasawa K, Ito K, Shimada H, Iwanami T, Sonoo M, Hatanaka Y, Murayama S, Uchibori A, Chiba A, Aizawa H, Momoo T, Nakae Y, Sakurai Y, Shiio Y, Hashida H, Yoshizawa T, Sakiyama Y, Oda A, Inoue K, Takeuchi S, Iwata N, Date H, Masuda N, Mikata T, Motoyoshi Y, Uesaka Y, Maeda M, Nakashima R, Tsuji S, Kwak S, Mimori T, Shimizu J. Anti-TIF1- γ antibody and cancer-associated myositis. *Neurology*. 2016b;87(3):299-308. doi:10.1212/WNL.0000000000002863
3. De Bleecker JL, De Paepe B, Aronica E, de Visser M, Amato A, Benveniste O, de Boer O, Dimachkie M, Gherardi R, Goebel H H, Hilton-Jones D, Holton J, Lundberg I, Mammen A, Mastaglia F, Nishino I, Rushing E, Schroder H, Selcen D, Stenzel W. 205th ENMC International Workshop: Pathology diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies part II 28-30 March 2014, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2015c;25(3):268-272. doi:10.1016/j.nmd.2014.12.001
4. Benveniste O, Stenzel W, Allenbach Y. Advances in serological diagnostics of inflammatory myopathies. *Curr Opin Neurol*. 2016d;29(5):662-673. doi:10.1097/WCO.0000000000000376
5. Allenbach Y, Benveniste O, Goebel H-H, Stenzel W. Integrated classification of inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2017e;43(1):62-81. doi:10.1111/nan.12380
6. Aouizerate J, De Antonio M, Bassez G, Gherardi R, Berenbaum F, Guillevin L, Berezne A, Valeyre D, Maisonobe T, Dubourg O, Cosnes A, Benveniste O, Authier F. Myofiber HLA-DR expression is a distinctive biomarker for antisynthetase-associated myopathy. *Acta Neuropathol Commun*. 2014f;2(1):154. doi:10.1186/s40478-014-0154-2
7. Wedderburn LR, McHugh NJ, Chinoy H, Cooper R. G., Salway F, Ollier W, McCann L, Varsani H, Dunphy J, North J, Davidson J. Juvenile Dermatomyositis Research Group (JDRG). HLA class II haplotype and autoantibody associations in children with juvenile dermatomyositis and juvenile dermatomyositis-scleroderma overlap. *Rheumatology*. 2007g;46(12):1786-1791. doi:10.1093/rheumatology/kem265
8. Badrising UA, Schreuder GMT, Giphart MJ, Geleijns K, Verschuuren J, Wintzen A, Maat-Schieman M, van Doorn P, van Engelen B, Faber C, Hoogendijk J, de Jager A, Koehler P, de Visser M, van Duinen S, Dutch IBM Study Group. Associations with autoimmune disorders and HLA class I and II antigens in inclusion body myositis. *Neurology*. 2004h;63(12):2396-2398. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15623710>. Accessed August 10, 2018.
9. Chinoy H, Adimulam S, Marriage F, New P, Vincze M, Zilahi E, Kapitány A, Gyetvai A, Ekholm L, Novota P, Remakova M, Charles P, McHugh N, Padyukov L, Alfredsson L, Vencovsky J, Lundberg I, Danko K, Ollier W, Cooper R. Interaction of HLA-DRB1*03 and smoking for the development of anti-Jo-1 antibodies in adult idiopathic inflammatory myopathies: a European-wide case study. *Ann Rheum Dis*. 2012i;71(6):961-965. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200182
10. Unverricht null. Dermatomyositis acuta. *DMW - Dtsch Medizinische Wochenschrift*. 1891j;17(02):41-44. doi:10.1055/s-0029-1206170
11. Levine TD. History of Dermatomyositis. *Arch Neurol*. 2003k;60(5):780. doi:10.1001/archneur.60.5.780
12. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and Dermatomyositis. *N Engl J Med*. 1975l;292(7):344-347. doi:10.1056/NEJM197502132920706
13. Yunis EJ, Samaha FJ. Inclusion body myositis. *Lab Invest*. 1971m;25(3):240-248. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5095321>. Accessed August 13, 2018.
14. Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, Choy E, Lundberg I, Rose M, Vencovsky J, de Visser M, Hughes R. 119th ENMC international workshop: Trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10–12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2004n;14(5):337-345. doi:10.1016/j.nmd.2004.02.006
15. Love LA, Leff RL, Fraser DD, Targoff I, Dalakas M, Plotz P, Miller F. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful

- homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore)*. 1991o;70(6):360-374. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1659647>. Accessed August 13, 2018.
16. Troyanov Y, Targoff IN, Tremblay J-L, Goulet J-R, Raymond Y, Sénécal J-L. Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine (Baltimore)*. 2005p;84(4):231-249. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16010208>. Accessed August 13, 2018.
 17. Pestronk A. Acquired immune and inflammatory myopathies: pathologic classification. *Curr Opin Rheumatol*. 2011q;23(6):595-604. doi:10.1097/BOR.0b013e32834bab42
 18. Fernandez C, Bardin N, De Paula AM, Salort-Campana E, Benyamine A, Franques J, Schleinitz N, Weiller P, Pouget J, Pellissier J, Figarella-Branger D. Correlation of Clinicoserologic and Pathologic Classifications of Inflammatory Myopathies. *Medicine (Baltimore)*. 2013r;92(1):15-24. doi:10.1097/MD.0b013e31827ebba1
 19. Selva-O'Callaghan A, Labrador-Horrillo M, Solans-Laque R, Simeon-Aznar CP, Martínez-Gómez X, Vilardell-Tarrés M. Myositis-specific and myositis-associated antibodies in a series of eighty-eight mediterranean patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum*. 2006s;55(5):791-798. doi:10.1002/art.22237
 20. Lega J-C, Fabien N, Reynaud Q, Durieu I, Durupt S, Dutertre M, Cordier J, Cottin V. The clinical phenotype associated with myositis-specific and associated autoantibodies: A meta-analysis revisiting the so-called antisynthetase syndrome. *Autoimmun Rev*. 2014t;13(9):883-891. doi:10.1016/j.autrev.2014.03.004
 21. Sordet C, Goetz J, Sibilia J. Contribution of autoantibodies to the diagnosis and nosology of inflammatory muscle disease. *Joint Bone Spine*. 2006u;73(6):646-654. doi:10.1016/j.jbspin.2006.04.005
 22. Koenig M, Fritzler MJ, Targoff IN, Troyanov Y, Sénécal J-L. Heterogeneity of autoantibodies in 100 patients with autoimmune myositis: insights into clinical features and outcomes. *Arthritis Res Ther*. 2007v;9(4):R78. doi:10.1186/ar2276
 23. van Dooren SHJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJM. Myositis-specific autoantibodies: detection and clinical associations. *Auto-Immun highlights*. 2011w;2(1):5-20. doi:10.1007/s13317-011-0018-8
 24. Stone KB, Oddis C V., Fertig N, Durieu I, Durupt S, Dutertre M, Cordier J, Cottin V. Anti-Jo-1 antibody levels correlate with disease activity in idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum*. 2007x;56(9):3125-3131. doi:10.1002/art.22865
 25. Nishikai M, Reichlin M. Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis and dermatomyositis. Characterization of the Jo-1 antibody system. *Arthritis Rheum*. 1980y;23(8):881-888. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7406938>. Accessed August 31, 2018.
 26. Dang C V. Intranuclear location of the myositis-specific Jo-1 antigen: hopping histidyl-tRNA synthetase? *Arthritis Rheum*. 1985z;28(7):839-840. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2409986>. Accessed August 31, 2018.
 27. Hervier B, Benveniste O. Clinical heterogeneity and outcomes of antisynthetase syndrome. *Curr Rheumatol Rep*. 2013aa;15(8):349. doi:10.1007/s11926-013-0349-8
 28. Solomon J, Swigris JJ, Brown KK. Myositis-related interstitial lung disease and antisynthetase syndrome. *J Bras Pneumol*. 2011ab;37(1):100-109. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21390438>. Accessed September 2, 2018.
 29. Hirakata M, Mimori T, Akizuki M, Craft J, Hardin JA, Homma M. Autoantibodies to small nuclear and cytoplasmic ribonucleoproteins in Japanese patients with inflammatory muscle disease. *Arthritis Rheum*. 1992ac;35(4):449-456. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1567494>. Accessed September 2, 2018.
 30. Mileti LM, Streck ME, Niewold TB, Curran JJ, Sweiss NJ. Clinical characteristics of patients with anti-Jo-1 antibodies: a single center experience. *J Clin Rheumatol*. 2009ad;15(5):254-255. doi:10.1097/RHU.0b013e3181b0e910
 31. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Huapaya JA, Albayda J, Paik J, Johnson C, Silhan L, Christopher-Stine L, Mamme A, Danoff S. A longitudinal cohort study of the anti-synthetase syndrome: Increased severity of interstitial lung disease in black patients and patients with anti-PL7 and anti-PL12 autoantibodies. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2017ae;56(6):999-1007. doi:10.1093/rheumatology/kex021

32. Asanuma Y, Koichihara R, Koyama S, Kawabata Y, Kobayashi S, Mimori T, Moriguchi M. Antisynthetase syndrome associated with sarcoidosis. *Intern Med.* 2006af;45(18):1065-1068. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17043379>. Accessed September 2, 2018.
33. Diaco M, Ancarini F, Montalto M, Verrechia E, Evoli A, Servidei S, Gasbarrini G, Manna R. Association of myasthenia gravis and antisynthetase syndrome: a case report. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2004ag;17(3):395-399. doi:10.1177/039463200401700320
34. Nouijai A, Ghazi M, Mounach A, Achemlal L, Bezza A, El Maghraoui A. Antisynthetase syndrome in a patient with ankylosing spondylitis. *Jt Bone Spine.* 2007ah;74(5):511-512. doi:10.1016/j.jbspin.2007.01.028
35. Rovenský J, Kovalancík M, Payer J, Kohler K. Klinefelter syndrome with antisynthetase syndrome: why might they be associated? *J Clin Rheumatol.* 2003ai;9(1):62-63. doi:10.1097/01.RHU.0000049718.58846.22
36. Szabo N, Lukacs S, Gunasekera W, Danko K. Rare association of antisynthetase syndrome and Kennedy's disease. *Clin Rheumatol.* 2008aj;27(10):1329-1331. doi:10.1007/s10067-008-0946-5
37. Thickett DR, Millar AB. Drug-induced antisynthetase syndrome. *Postgrad Med J.* 1997ak;73(857):165-166. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9135834>. Accessed September 2, 2018.
38. Hervier B, Devilliers H, Stanciu R, Meyer A, Uzunhan Y, Masseau A, Dubucquoi S, Hatron P, Musset L, Wallaert B, Nunes H, Maisonobe T, Olsson N, Adoue D, Arle P, Sibilia J, Guigue M, Lauque D, Amoura Z, Hachulla E, Hamidou M, Benveniste O. Hierarchical cluster and survival analyses of antisynthetase syndrome: Phenotype and outcome are correlated with anti-tRNA synthetase antibody specificity. *Autoimmun Rev.* 2012al;12(2):210-217. doi:10.1016/j.autrev.2012.06.006
39. Labirua-Iturburu A, Selva-O'Callaghan A, Vincze M, Dankó K, Vencovsky J, Fisher B, Charles P, Dastmalchi M, Lundberg I. Anti-PL-7 (Anti-Threonyl-tRNA synthetase) Antisynthetase syndrome: Clinical manifestations in a series of patients from a european multicenter study (EUMYONET) and review of the literature. *Med (United States).* 2012am;91(4):206-211. doi:10.1097/MD.0b013e318260977c
40. Hervier B, Uzunhan Y, Hachulla E, Benveniste O, Nunes H, Delaval P, Musset L, Dubucquoi S, Wallaert B, Hamidou M. Antisynthetase syndrome positive for anti-threonyl-tRNA synthetase (anti-PL7) antibodies. *Eur Respir J.* 2011an;37(3):714-717. doi:10.1183/09031936.00104310
41. Hervier B, Wallaert B, Hachulla E, Adoue D, Lauque D, Audrain M, Camara B, Fournie B, Couret B, Hatron P, Dubucquoi S, Hamidou M. Clinical manifestations of anti-synthetase syndrome positive for anti-alanyl-tRNA synthetase (anti-PL12) antibodies: a retrospective study of 17 cases. *Rheumatology.* 2010ao;49(5):972-976. doi:10.1093/rheumatology/kep455
42. Kalluri M, Sahn SA, Oddis C V., Gharib S, Christopher-Stine Li, Danoff S, Casciola-Rosen L, Hong G, Dellaripa P, Highland K. Clinical Profile of Anti-PL-12 Autoantibody. *Chest.* 2009ap;135(6):1550-1556. doi:10.1378/chest.08-2233
43. Hamaguchi Y, Fujimoto M, Matsushita T, Matsushita T, Kaji K, Komura K, Hasegawa M, Kodera M, Muroi E, Fujikawa K, Seishima M, Yamada H, Yamada R, Sato S, Takehara K, Kuwana M. Common and Distinct Clinical Features in Adult Patients with Anti-Aminoacyl-tRNA Synthetase Antibodies: Heterogeneity within the Syndrome. Miller F, ed. *PLoS One.* 2013aq;8(4):e60442. doi:10.1371/journal.pone.0060442
44. Aggarwal R, Cassidy E, Fertig N, Koontz D, Lucas M, Ascherman D, Oddis C. Patients with non-Jo-1 anti-tRNA-synthetase autoantibodies have worse survival than Jo-1 positive patients. *Ann Rheum Dis.* 2014ar;73(1):227-232. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201800
45. Mariampillai K, Granger B, Amelin D, Guiguet M, Hachulla E, Maurier F, Meyer A, Tohmé A, Charuel J, Musset L, Allenbach Y, Benveniste O. Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. *JAMA Neurol.* September 2018as. doi:10.1001/jamaneurol.2018.2598
46. Marie I, Dominique S, Janvresse A, Levesque H, Menard J-F. Rituximab therapy for refractory interstitial lung disease related to antisynthetase syndrome. *Respir Med.* 2012at;106(4):581-587. doi:10.1016/j.rmed.2012.01.001
47. Pestronk A. Immune and inflammatory myopathies: pathology. Neuromuscular Disease Center.

- <https://neuromuscular.wustl.edu/antibody/infmyop.htm>. Published 1611au. Accessed September 4, 2018.
48. Zierz S, ed. *Muskelerkrankungen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014av. doi:10.1055/b-002-96293
 49. Lüllmann-Rauch R. *Taschenbuch Histologie*. Thieme; 2015aw. <https://www.thieme.de/shop/Anatomie-Histologie-Embryologie/Luellmann-Rauch-Asan-Taschenlehrbuch-Histologie-9783131292452/p/000000000145900105>. Accessed September 4, 2018.
 50. Mozaffar T, Pestronk A. Myopathy with anti-Jo-1 antibodies: Pathology in perimysium and neighbouring muscle fibres. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000ax;68(4):472-478. doi:10.1136/jnnp.68.4.472
 51. Dalakas MC. Polymyositis, Dermatomyositis, and Inclusion-Body Myositis. *N Engl J Med*. 1991ay;325(21):1487-1498. doi:10.1056/NEJM199111213252107
 52. Kayser FH, Böttger EC, Deplazes P, Haller O, Roers A, eds. *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014az. doi:10.1055/b-002-98020
 53. Mescam-Mancini L, Allenbach Y, Hervier B, Devilliers H, Mariampillay K, Dubourg O, Maisonobe T, Gherardi R, Mezin P, Preusse C, Stenzel W, Benveniste O. Anti-Jo-1 antibody-positive patients show a characteristic necrotizing perifascicular myositis. *Brain*. 2015ba;138(9):2485-2492. doi:10.1093/brain/awv192
 54. Stenzel W, Preuß C, Allenbach Y, Pehl D, Junckerstorff R, Heppner F, Nolte K, Aronica E, Kana V, Rushing E, Schneider U, Claeys K, Benveniste O, Weis J, Goebel H-H. Nuclear actin aggregation is a hallmark of anti-synthetase syndrome-induced dysimmune myopathy. *Neurology*. 2015bb;84(13):1346-1354. doi:10.1212/WNL.0000000000001422
 55. Domazetovska A, Ilkovski B, Cooper ST, Ghoddsi M, Hardeman E, Minamide L, Gunning P, Bamberg J, North K. Mechanisms underlying intranuclear rod formation. *Brain*. 2007bc;130(12):3275-3284. doi:10.1093/brain/awm247
 56. Bettinger BT, Gilbert DM, Amberg DC. Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004bd;5(5):410-415. doi:10.1038/nrm1370
 57. Huet G, Skarp K-P, Vartiainen MK. Nuclear actin levels as an important transcriptional switch. *Transcription*. 2012be;3(5):226-230. doi:10.4161/trns.21062
 58. Katsumaru H, Fukui Y. In vivo identification of Tetrahymena actin probed by DMSO induction nuclear bundles. *Exp Cell Res*. 1982bf;137(2):353-363. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6799309>. Accessed September 6, 2018.
 59. Ohta Y, Nishida E, Sakai H, Miyamoto E. Dephosphorylation of cofilin accompanies heat shock-induced nuclear accumulation of cofilin. *J Biol Chem*. 1989bg;264(27):16143-16148. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2777782>. Accessed September 6, 2018.
 60. Korn ED. *Actin Polymerization and Its Regulation by Proteins From Nonmuscle Cells*. Vol 62.; 1982bh. www.physiology.org/journal/physrev. Accessed September 6, 2018.
 61. Xu YZ, Thuraisingam T, de Lima Morais DA, Rola-Pleszczynski M, Radzioch D. Nuclear Translocation of β -Actin Is Involved in Transcriptional Regulation during Macrophage Differentiation of HL-60 Cells. Wickens M, ed. *Mol Biol Cell*. 2010bi;21(5):811-820. doi:10.1091/mbc.e09-06-0534
 62. Hofmann WA. Chapter 6 Cell and Molecular Biology of Nuclear Actin. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Vol 273. ; 2009bj:219-263. doi:10.1016/S1937-6448(08)01806-6
 63. Stüven T, Hartmann E, Görlich D. Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *EMBO J*. 2003bk;22(21):5928-5940. doi:10.1093/emboj/cdg565
 64. Yoo Y, Wu X, Guan J-L. A novel role of the actin-nucleating Arp2/3 complex in the regulation of RNA polymerase II-dependent transcription. *J Biol Chem*. 2007bl;282(10):7616-7623. doi:10.1074/jbc.M607596200
 65. Hofmann WA, Stojiljkovic L, Fuchsova B, Vargas G, Mavrommatis E, Philimonenko V, Kysela K, Goodrich J, Lessard J, Hope T, Hozak P, de Lanerolle P. Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol*. 2004bm;6(11):1094-1101. doi:10.1038/ncb1182

66. Domazetovska A, Ilkovski B, Kumar V, Valova V, Vandebrouck A, Hutchinson D, Robinson P, Cooper S, Sparrow J, Peckham M, North K. Intranuclear rod myopathy: molecular pathogenesis and mechanisms of weakness. *Ann Neurol*. 2007bn;62(6):597-608. doi:10.1002/ana.21200
67. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*.
68. Blum HE, Müller-Wieland D, eds. *Klinische Pathophysiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2018bp. doi:10.1055/b-004-132250
69. Hettenkofer H-J, Schneider M, Braun J, eds. *Rheumatologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2015bq. doi:10.1055/b-002-101344
70. Shiomi A, Usui T, Ishikawa Y, Shimizu M, Murakami K, Mimori T. GM-CSF but Not IL-17 Is Critical for the Development of Severe Interstitial Lung Disease in SKG Mice. *J Immunol*. 2014br;193(2):849-859. doi:10.4049/jimmunol.1303255
71. Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Sierro S, Horvath E, Hengartner H, Zinkernagel RM. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000bs;97(24):13263-13268. doi:10.1073/pnas.230417497
72. Slifka MK, Ahmed R. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol*. 1998bt;10(3):252-258. doi:10.1016/S0952-7915(98)80162-3
73. Maruyama M, Lam K-P, Rajewsky K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature*. 2000bu;407(6804):636-642. doi:10.1038/35036600
74. Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S, Mei H, Radtke H, Gromnica-Ihle E, Burmester G, Arnold R, Radbruch A, Hiepe F. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood*. 2009bv;113(1):214-223. doi:10.1182/blood-2008-07-168286
75. Yoshida T, Mei H, Dörner T, Hiepe F, Radbruch A, Fillatreau S, Hoyer B. Memory B and memory plasma cells. *Immunol Rev*. 2010bw;237(1):117-139. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00938.x
76. Hiepe F, Radbruch A. Plasma cells as an innovative target in autoimmune disease with renal manifestations. *Nat Rev Nephrol*. 2016bx;12(4):232-240. doi:10.1038/nrneph.2016.20
77. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith K, Dörner T, Hiepe F. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol*. 2006by;6(10):741-750. doi:10.1038/nri1886
78. Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, Geha R, Xu S, Lam K, Noelle R. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J Immunol*. 2008bz;180(6):3655-3659. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18322170>. Accessed September 18, 2018.
79. Chung W-H, Hung S-I, Hong H-S, Hsieh M, Yang L, Ho H, Wu J, Chen Y. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature*. 2004ca;428(6982):486. doi:10.1038/428486a
80. Walker EJ, Jeffrey PD. Sequence homology between encephalomyocarditis virus protein VPI and histidyl-tRNA synthetase supports a hypothesis of molecular mimicry in polymyositis. *Med Hypotheses*. 1988cb;25(1):21-25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2830474>. Accessed September 19, 2018.
81. Miller FW, Waite KA, Biswas T, Plotz PH. The role of an autoantigen, histidyl-tRNA synthetase, in the induction and maintenance of autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990cc;87(24):9933-9937. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1702223>. Accessed September 19, 2018.
82. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science (80-)*. 2003cd;301(5638):1374-1377. doi:10.1126/science.1086907
83. Mandik-Nayak L, Seo SJ, Sokol C, Potts KM, Bui A, Erikson J. MRL-lpr/lpr mice exhibit a defect in maintaining developmental arrest and follicular exclusion of anti-double-stranded DNA B cells. *J Exp Med*. 1999ce;189(11):1799-1814. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359584>. Accessed September 18, 2018.
84. Brard F, Shannon M, Prak EL, Litwin S, Weigert M. Somatic mutation and light chain rearrangement generate autoimmunity in anti-single-stranded DNA transgenic MRL/lpr mice. *J*

- Exp Med.* 1999cf;190(5):691-704. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477553>. Accessed September 18, 2018.
85. Lesley R, Xu Y, Kalled SL, Hess D, Schwab S, Shu H, Cyster J. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity.* 2004cg;20(4):441-453. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084273>. Accessed September 18, 2018.
 86. Hiepe F, Dörner T, Hauser AE, Hoyer BF, Mei H, Radbruch A. Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. *Nat Rev Rheumatol.* 2011ch;7(3):170-178. doi:10.1038/nrrheum.2011.1
 87. Kryšůfková O, Hulejová H, Mann HF, Pecha O, Půtová I, Ekholm L, Lundberg I, Vencovský J. Serum levels of B-cell activating factor of the TNF family (BAFF) correlate with anti-Jo-1 autoantibodies levels and disease activity in patients with anti-Jo-1 positive polymyositis and dermatomyositis. doi:10.1186/s13075-018-1650-8
 88. Aggarwal R, Oddis C V., Goudeau D, Koontz D, Qi Z, Reed A, Ascherman D, Levesqu M. Autoantibody levels in myositis patients correlate with clinical response during B cell depletion with rituximab. *Rheumatology.* 2016cj;55(6):991-999. doi:10.1093/rheumatology/kev444
 89. Casciola-Rosen L, Nagaraju K, Plotz P, Wang K, Levine S, Gabrielson E, Corse A, Rosen A. Enhanced autoantigen expression in regenerating muscle cells in idiopathic inflammatory myopathy. *J Exp Med.* 2005ck;201(4):591-601. doi:10.1084/jem.20041367
 90. Ascherman DP. Animal Models of Inflammatory Myopathy. *Curr Rheumatol Rep.* 2012cl;14(3):257-263. doi:10.1007/s11926-012-0245-7
 91. Fernandez I, Harlow L, Zang Y, Liu-Bryan R, Ridgway W, Clemens P, Ascherman D. Functional Redundancy of MyD88-dependent Signaling Pathways in a Murine Model of Histidyl-tRNA Synthetase-induced Myositis. *J Immunol.* 2013cm;4(191):1865-1872. doi:10.1126/scisignal.2001449.Engineering
 92. Howard OMZ, Dong HF, Yang D, Raben N, Nagaraju K, Rosen A, Casciola-Rosen L, Härtlein M, Kron M, Yang D, Yiadom K, Dwivedi S, Plotz P, Oppenheim J. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2002cn;196(6):781-791. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235211>. Accessed September 24, 2018.
 93. Nagaraju K, Raben N, Villalba ML, Villalba M, Danning C, Loeffler L, Lee E, Tresser N, Abati A, Fetsch P, Plotz P. Costimulatory Markers in Muscle of Patients with Idiopathic Inflammatory Myopathies and in Cultured Muscle Cells. *Clin Immunol.* 1999co;92(2):161-169. doi:10.1006/clim.1999.4743
 94. Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med.* 1999cp;190(6):815-826. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499920>. Accessed September 24, 2018.
 95. Levine SM, Raben N, Xie D, Askin F, Tuder R, Mullins M, Rosen A, Casciola-Rosen L. Novel conformation of histidyl-transfer RNA synthetase in the lung. *Arthritis Rheum.* 2007cq;56(8):2729-2739. doi:10.1002/art.22790
 96. Zhou JJ, Wang F, Xu Z, Lo W, Lau C, Chiang K, Nangle L, Ashlock M, Mendlein J, Yang X, Zhang M, Schimmel P. Secreted histidyl-tRNA synthetase splice variants elaborate major epitopes for autoantibodies in inflammatory myositis. *J Biol Chem.* 2014cr;289(28):19269-19275. doi:10.1074/jbc.C114.571026
 97. Aquino-Galvez A, Pérez-Rodríguez M, Camarena Á, Falfan-Valencia R, Ruiz V, Montaña M, Barrera L, Sada-Ovalle I, Ramírez R, Granados J, Pardo A, Selman M. MICA polymorphisms and decreased expression of the MICA receptor NKG2D contribute to idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility. *Hum Genet.* 2009cs;125(5-6):639-648. doi:10.1007/s00439-009-0666-1
 98. Hervier B, Perez M, Allenbach Y, Devilliers H, Cohen F, Uzunhan Y, Ouakrim H, Dorgham K, Méritet J, Longchamp E, Stenzel W, Cremer I, Benveniste O, Vieillard V. Involvement of NK Cells and NKp30 Pathway in Antisynthetase Syndrome. *J Immunol.* 2016ct;197(5):1621-1630. doi:10.4049/jimmunol.1501902
 99. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2001cu;13(1):114-119. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11154927>. Accessed September

- 24, 2018.
100. Walsh RJ, Kong SW, Yao Y, Jallal B, Kiener P, Pinkus J, Beggs A, Amato A, Greenberg S. Type I interferon-inducible gene expression in blood is present and reflects disease activity in dermatomyositis and polymyositis. *Arthritis Rheum.* 2007cv;56(11):3784-3792. doi:10.1002/art.22928
 101. Eloranta M-L, Barbasso Helmers S, Ulfgren A-K, Rönnblom L, Alm G V, Lundberg IE. A possible mechanism for endogenous activation of the type I interferon system in myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro 52/anti-Ro 60 autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 2007cw;56(9):3112-3124. doi:10.1002/art.22860
 102. Lundberg IE, Barbasso Helmers S. The type I interferon system in idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity.* 2010cx;43(3):239-243. doi:10.3109/08916930903510955
 103. Ascherman DP. Role of Jo-1 in the Immunopathogenesis of the Anti-synthetase Syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 2015cy;17(9):56. doi:10.1007/s11926-015-0532-1
 104. Szyszko EA, Brokstad KA, Oijordsbakken G, Jonsson M V, Jonsson R, Skarstein K. Salivary glands of primary Sjögren's syndrome patients express factors vital for plasma cell survival. *Arthritis Res Ther.* 2011cz;13(1):R2. doi:10.1186/ar3220
 105. Oertel B. B. Romeis, Mikroskopische Technik (17. neubearbeitete und erweiterte Auflage, herausgegeben von P. BÖCK). 697 S., 49 Abb., ca. 40 Tab. München – Wien – Baltimore 1989. Urban und Schwarzenberg. DM 148,00. ISBN: 3-541-11227-1. *J Basic Microbiol.* 1990da;30(2):144-144. doi:10.1002/jobm.3620300221
 106. Kryštůfková O, Barbasso Helmers S, Venalis P, Malmström V, Lindroos E, Vencovský J, Lundberg I. Expression of BAFF receptors in muscle tissue of myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro52/anti-Ro60 autoantibodies. *Arthritis Res Ther.* 2014db;16(5):454. doi:10.1186/s13075-014-0454-8
 107. Morais SA, Vilas-Boas A, Isenberg DA. B-cell survival factors in autoimmune rheumatic disorders. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2015dc;7(4):122-151. doi:10.1177/1759720X15586782
 108. Comte D, Karampetsou MP, Tsokos GC. T cells as a therapeutic target in SLE. *Lupus.* 2015dd;24(4-5):351-363. doi:10.1177/0961203314556139
 109. Sohara E, Saraya T, Sato S, Tsujimoto N, Watanabe T, Takata S, Tanaka Y, Ishii H, Takizawa H, Goto H. Mechanic's hands revisited: is this sign still useful for diagnosis in patients with lung involvement of collagen vascular diseases? *BMC Res Notes.* 2014de;7:303. doi:10.1186/1756-0500-7-303
 110. Wang J, Shi S, Li H, Yang Y, Zhang Q, Peng X, Lu G. Autoantibodies Clinical Profiles and Prognosis of Patients with Distinct Antisynthetase. *J Rheumatol J Rheumatol Novemb.* 2017df;44(7):1051-1057. doi:10.3899/jrheum.161480
 111. Aoyama J, Hayashi H, Yajima C, Takoi H, Tanaka T, Kashiwada T, Kokuho N, Terasaki Y, Nishikawa A, Gono T, Kuwana M, Saito Y, Abe S, Seike M, Gemma A. Anti-MDA5 antibody-positive rapidly progressive interstitial pneumonia without cutaneous manifestations. *Respir Med Case Reports.* 2019dg;26:193-196. doi:10.1016/j.rmcr.2019.01.012
 112. Suzuki S, Yonekawa T, Kuwana M, Hayashi Y, Okazaki Y, Kawaguchi Y, Suzuki N, Nishino I. Clinical and histological findings associated with autoantibodies detected by RNA immunoprecipitation in inflammatory myopathies. *J Neuroimmunol.* 2014dh;274(1-2):202-208. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.07.006
 113. Noguchi E, Uruha A, Suzuki S, Hamanaka K, Ohnuki Y, Tsugawa J, Watanabe Y, Nakahara J, Shiina T, Suzuki N, Nishino I. Skeletal muscle involvement in antisynthetase syndrome. *JAMA Neurol.* 2017di;74(8):992-999. doi:10.1001/jamaneurol.2017.0934
 114. Sun L, Ma K, Wang H, Xiao F, Gao Y, Zhang W, Wang K, Gao X, Ip N, Wu Z. JAK1-STAT1-STAT3, a key pathway promoting proliferation and preventing premature differentiation of myoblasts. *J Cell Biol.* 2007dj;179(1):129-138. doi:10.1083/jcb.200703184
 115. De Visser M, Emslie-Smith AM, Engel AG. Early ultrastructural alterations in adult dermatomyositis. Capillary abnormalities precede other structural changes in muscle. *J Neurol Sci.* 1989dk;94(1-3):181-192. doi:10.1016/0022-510X(89)90228-1
 116. Kim J, Lee J. Role of transforming growth factor- β in muscle damage and regeneration: focused on eccentric muscle contraction. *J Exerc Rehabil.* 2017dl;13(6):621-626.

doi:10.12965/jer.1735072.536

117. Winter O, Dame C, Jundt F, Hiepe F. Pathogenic long-lived plasma cells and their survival niches in autoimmunity, malignancy, and allergy. *J Immunol.* 2012dm;189(11):5105-5111. doi:10.4049/jimmunol.1202317
118. Manz RA, Arce S, Cassese G, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol.* 2002dn;14(4):517-521. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088688>. Accessed November 28, 2018.
119. Fujiyama T, Ito T, Ogawa N, Suda T, Tokura Y, Hashizume H. Preferential infiltration of interleukin-4-producing CXCR4⁺ T cells in the lesional muscle but not skin of patients with dermatomyositis. *Clin Exp Immunol.* 2014do;177(1):110-120. doi:10.1111/cei.12311
120. Gattorno M, Prigione I, Morandi F, Gregorio A, Chiesa S, Ferlito F, Favre A, Uccelli A, Gambini C, Martini A, Pistoia V. Phenotypic and functional characterisation of CCR7⁺ and CCR7⁻ CD4⁺ memory T cells homing to the joints in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004dp;7(2):R256. doi:10.1186/ar1485
121. Kowalski K, Kołodziejczyk A, Sikorska M, Płaczkiewicz J, Cichosz P, Kowalewska M, Stremińska W, Jańczyk-Ilach K, Kobłowska M, Fogtman A, Iwanicka-Nowicka R, Ciemerych M, Brzoska E. Stem cells migration during skeletal muscle regeneration - the role of Sdf-1/Cxcr4 and Sdf-1/Cxcr7 axis. *Cell Adhes Migr.* 2017dq;11(4):384-398. doi:10.1080/19336918.2016.1227911
122. Ratajczak MZ, Majka M, Kucia M, Drukala J, Pietrzkowski Z, Peiper S, Janowska-Wieczorek A. Expression of Functional CXCR4 by Muscle Satellite Cells and Secretion of SDF-1 by Muscle-Derived Fibroblasts is Associated with the Presence of Both Muscle Progenitors in Bone Marrow and Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in Muscles. *Stem Cells.* 2003dr;21(3):363-371. doi:10.1634/stemcells.21-3-363
123. Döring Y, Pawig L, Weber C, Noels H. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front Physiol.* 2014ds;5:212. doi:10.3389/fphys.2014.00212
124. Jiang D, Liang J, Hodge J, Lu B, Zhu Z, Yu S, Fan J, Gao Y, Yin Z, Homer R, Gerard C, Noble P. Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3. *J Clin Invest.* 2004dt;114(2):291-299. doi:10.1172/JCI16861
125. Hauser AE, Debes GF, Arce S, Cassese G, Hamann A, Radbruch A, Manz R. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol.* 2002du;169(3):1277-1282. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12133949>. Accessed December 1, 2018.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Barbara, Paesler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Antikörperspezifische Unterschiede und die zentrale Rolle langlebiger Plasmazellen beim Antisynthetase Syndrom; Antibody-specific differences and the key role of long-lived plasma cells in antisynthetase syndrome] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Zunächst möchte ich *Herrn Prof. Dr. Frank Heppner* für die Möglichkeit danken, an seinem Institut zu promovieren und außerdem dem gesamten Team des Instituts für Neuropathologie für ihre großartige Unterstützung.

Ganz besonders aber möchte ich *Herrn Prof. Dr. Werner Stenzel* für die inhaltliche Ausrichtung und die thematische Eingrenzung danken, die meine Arbeit erst ermöglicht haben, und für seine Bereitschaft, zu jeder Zeit mit seinem unerschöpflichen Fundus an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen für konstruktive Gespräche zur Verfügung zu stehen. Für konstruktive Anregungen danke ich auch *Frau Dr. rer. nat. Corinna Preuße*, die mir als Zweitbetreuerin zur Seite stand. Ohne ihren wertvollen akademischen Rat wäre diese Arbeit nicht entstanden. Dass die beiden an meine Fähigkeiten und meine Arbeit geglaubt haben, hat maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss meiner Dissertation beigetragen.

Für vielfältige Unterstützung und den Zugang zu Patientendaten, sowie Gewebeproben bin ich auch *Herrn Dr. Yves Allenbach* vom Hôpital Pitié-Salpêtrière in Paris, sowie *Frau Dr. Nathalie Streichenberger* und *Frau Dr. Laure Gallay* vom Hospices Civils in Lyon dankbar.