

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

DISSERTATION

Identifikation pathogenetischer Signaturen für die
Dermatomyositis – mit Fokus auf PD1 und Typ I Interferon
Signalwegen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alina Scholz

aus Wien, Österreich

Datum der Promotion:04.03.2022.....

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis | 3 |
| Abbildungsverzeichnis | 5 |
| Tabellenverzeichnis | 6 |
| Abkürzungsverzeichnis | 8 |
| Abstract | 11 |
| Zusammenfassung | 13 |
| 1. Einführung | 15 |
| 1.1. Myositis-spezifische Antikörper | 16 |
| 1.1.1. Anti-Mi-2 Antikörper | 16 |
| 1.1.2. Anti-TIF-1 γ Antikörper | 17 |
| 1.1.3. Anti-MDA5 Antikörper | 18 |
| 1.2. Zwei Hypothesen zur Krankheitsentstehung | 19 |
| 1.2.1. Interferon-Hypothese | 20 |
| 1.2.2. Immuncheckpoint-Hypothese | 23 |
| 1.2.3. Der PD1 Signalweg als Grundlage autoimmuner Reaktionen in DM | 24 |
| 2. Material | 27 |
| 3. Methoden | 30 |
| 3.1. Patienten und Muskelbiopsien | 30 |
| 3.2. Histologie | 31 |
| 3.2.1. Immunhistochemie | 31 |
| 3.2.2. Immunfluoreszenz | 32 |
| 3.3. Quantifizierung | 32 |
| 3.3.1. Semiquantitativer Score | 32 |
| 3.3.2. Zellzahl | 33 |
| 3.4. Molekularbiologische Methoden | 34 |
| 3.4.1. DNA-Isolation | 34 |
| 3.4.2. Gelelektrophorese | 35 |
| 3.4.3. Quantifizierung und Konzentrationsmessung der DNA | 35 |
| 3.4.4. RNA-Isolation | 35 |
| 3.4.5. cDNA-Synthese | 36 |
| 3.4.6. Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (<i>qPCR</i>) | 37 |
| 3.4.7. Whole Exome Sequenzierung (WES) | 38 |
| 3.5. Statistische Analyse | 43 |
| 4. Ergebnisse | 44 |
| 4.1. Epidemiologische und klinische Charakteristika der Patienten | 44 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.2. | Morphologische Untersuchungen | 52 |
| 4.2.1. | Histologie gesunder Kontrollpatienten | 52 |
| 4.2.2. | Charakterisierung von Dermatomyositis Patienten | 53 |
| 4.3. | Zusammenfassung der klinischen und histologischen Ergebnisse | 57 |
| 4.4. | Lokalisierung und Expression von PD1 und seinen Ligand L1 und L2 | 59 |
| 4.5. | Zusammenfassung der Ergebnisse zu dem Immuncheckpoint-Inhibitor PD1 und seinen Liganden..... | 68 |
| 4.6. | Die Rolle des PD1 Signalweges in unterschiedlichen DM Antikörpergruppen .. | 69 |
| 4.7. | Interferon-Signatur | 72 |
| 4.8. | Charakterisierung der gefundenen Genveränderungen | 76 |
| 4.9. | Ergebnisse der Literaturrecherche..... | 84 |
| 4.10. | Abschließender Überblick der Ergebnisse | 85 |
| 5. | Diskussion | 92 |
| 5.1. | Dermatomyositis Signaturen: DM spezifische und AK spezifische Gene | 95 |
| 5.1.1. | DM spezifische Gene | 95 |
| 5.1.2. | AK spezifische Gene..... | 101 |
| 5.2. | Der PD1 Signalweg als Grundlage autoimmuner Reaktionen bei Patienten mit DM | 102 |
| 5.2.1. | Genetische Grundlagen als Ursache eines gestörten PD1 Signalweges. | 106 |
| 5.2.2. | Gene des PD1 Signalweges | 107 |
| 5.3. | Ursprung der Interferon-Signatur | 112 |
| 5.3.1. | Prädisponierende Gene der IFN-Signatur..... | 113 |
| 5.3.2. | Gene der IFN-Signatur mit möglicher primärer Rolle in der Pathogenese | 118 |
| 5.4. | Fazit und Ausblick | 124 |
| 5.4.1. | Stärken und Schwächen der Studie..... | 126 |
| 5.4.2. | Klinische Bedeutung und therapeutische Konsequenzen | 128 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 131 |
| | Eidesstattliche Versicherung..... | 166 |
| | Lebenslauf..... | 167 |
| | Danksagung | 168 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Flowchart zur Auswertung der WES Daten..... | 42 |
| Abbildung 2: Repräsentative Färbungen in einer Muskelbiopsie eines gesunden Kontrollpatienten..... | 52 |
| Abbildung 3: Grundlegendes Schädigungsmuster in der Skelettmuskulatur bei DM Patienten mit unterschiedlichen Autoantikörpern (I) | 54 |
| Abbildung 4: Grundlegendes Schädigungsmuster in der Skelettmuskulatur bei DM Patienten mit unterschiedlichen Autoantikörpern (II) | 56 |
| Abbildung 5: PD1 ⁺ Zellen in Skelettmuskelbiopsaten bei Patienten mit unterschiedlichen DM Autoantikörpern..... | 59 |
| Abbildung 6: Quantifizierung PD1 ⁺ Zellen/10 HPF in Skelettmuskelbiopsaten von Patienten mit DM mit unterschiedlichen Autoantikörpern | 60 |
| Abbildung 7: PD-L1 ⁺ und PD-L2 ⁺ Strukturen in Skelettmuskelbiopsaten von Patienten mit DM und unterschiedlichen Autoantikörpern | 61 |
| Abbildung 8: PD-L1 und PD-L2 positive Strukturen bei Patienten mit unterschiedlichen DM Autoantikörpern..... | 62 |
| Abbildung 9: Genexpressionlevels für PD1, PD-L1 und PD-L2 bei Patienten mit DM ... | 63 |
| Abbildung 10: Lokalisation von PD1 auf Immunzellen in Skelettmuskelbiopsaten bei Patienten mit DM..... | 65 |
| Abbildung 11: Lokalisation von PD-L1 und PD-L2 in Skelettmuskelbiopsaten bei Patienten mit DM..... | 67 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Phänotypen des Dermatomyositis Spektrums..... | 19 |
| Tabelle 2: Laborausrüstung | 27 |
| Tabelle 3: Allgemeine Chemikalien | 27 |
| Tabelle 4: Primäre Antikörper- Immunhistochemie | 28 |
| Tabelle 5: Sekundäre Antikörper- Immunhistochemie..... | 29 |
| Tabelle 6: Kommerzielle Kits..... | 29 |
| Tabelle 7: PCR Sonden FIRMA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA..... | 29 |
| Tabelle 8: Semiquantitativer Score für PD-L1 | 33 |
| Tabelle 9: Semiquantitativer Score für PD-L2..... | 33 |
| Tabelle 10: cDNA-Synthese unter folgenden Reaktionsbedingungen | 37 |
| Tabelle 11: Reaktionsbedingungen der qPCR | 37 |
| Tabelle 12: Auflistung der Kandidatengene des PD1-Signalweges | 39 |
| Tabelle 13: Auflistung der Kandidatengene der Interferon-Signatur..... | 40 |
| Tabelle 14: Zusammenfassung der klinischen Patientencharakteristika | 46 |
| Tabelle 15: Epidemiologische und klinische Charakteristika der Mi-2 ⁺ Patienten | 47 |
| Tabelle 16: Epidemiologische und klinische Charakteristika der TIF1- γ ⁺ Patienten | 48 |
| Tabelle 17: Epidemiologische und klinische Charakteristika der MDA5 ⁺ Patienten | 50 |
| Tabelle 18: Epidemiologische und klinische Charakteristika der gesunden Kontrollprobanden (NDC) | 51 |
| Tabelle 19 Zusammenfassung der histologischen und klinischen Ergebnisse | 58 |
| Tabelle 20: Lokalisation und Genexpressionslevel von PD1, PD-L1 und PD-L2 | 68 |
| Tabelle 21: Mutationsload im Genom der untersuchten Patientenmuskeln | 70 |
| Tabelle 22: DM spezifische und AK spezifische Gene bei Patienten mit DM | 71 |
| Tabelle 23: Veränderte Gene des PD1 Signalweges | 72 |
| Tabelle 24: Veränderte Gene der Interferon-Signatur | 73 |
| Tabelle 25: Prädisponierende Gene der IFN-Signatur | 76 |
| Tabelle 26: Gene mit möglicher primärer Rolle in der Pathophysiologie der DM | 78 |
| Tabelle 27: DM spezifische Gene | 79 |
| Tabelle 28: AK spezifische Gene | 82 |
| Tabelle 29: Gene des PD1 Signalweges | 83 |
| Tabelle 30: Prädisponierende Gene der Interferon-Signatur | 86 |
| Tabelle 31: Gene mit möglicher primärer Rolle in der Pathophysiologie der DM | 88 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 32: DM spezifische Gene | 89 |
| Tabelle 33: AK spezifische Gene | 90 |
| Tabelle 34: Gene des PD1 Signalweges | 91 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|---|
| aDM | adulte Dermatomyositis |
| AGAP4 | ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 4 |
| AIH | Autoimmunhepatitis |
| AK | Antikörper |
| ANKRD36 | ankyrin repeat domain 36 |
| ANP32B | acidic nuclear phosphoprotein 32 family member B |
| ASyS | Antisynthetase Syndrom |
| B3GAT1 | beta-1,3-glucuronyltransferase 1 |
| CABP1 | calcium binding protein 1 |
| CDASI | Cutaneous Dermatomyositis Disease Area and Severity Index |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CK | Kreatinkinase |
| CNN | Calponin |
| CRC | kolorektales Karzinom |
| CTLA-4 | cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 |
| DAMP | Damage-associated molecular pattern |
| DC | dendritische Zellen |
| DCM | Dilatative Kardiomyopathie |
| DM | Dermatomyositis |
| EOMES | Eomesodermin |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| ET | essentielle Thrombozytose |
| FSHD | Facioscapulohumerale Muskeldystrophie |
| GBM | Glioblastom |
| GWAS | genome-wide association studies |
| HGF | hepatocyte growth factor |
| HLA | humanes Leukozyten Antigen |
| HPF | high power field |
| HRAS | harvey rat sarcoma |
| IBD | inflammatory bowel disease |
| IBM | Einschlußkörper-Myositis |
| IFI16 | Interferon gamma inducible protein 16 |

| | |
|-----------------------------------|---|
| IFI44L | Interferon induced protein 44-like |
| IFNAR | Interferon alpha and beta receptor subunit 1 |
| IgG4 | Immunglobulin G4 Antikörper |
| ILD | interstitial lung disease |
| IMNM | immun-medierte nekrotisierende Myopathie |
| InsP ₃ | Inositoltrisphosphat |
| Interferon-Signatur, IFN-Signatur | Interferon Typ 1 Signatur |
| irAEs | immuno-therapy-related adverse events |
| irMyositis | immune checkpoint inhibitor-related |
| ISG | Interferon-stimulierte Gene |
| ITPR3 | Inositol-1,4,5-Triphosphat-Receptor Type 3 |
| JADE2 | jade family PHD finger 2 |
| JAK | Janus kinases |
| jDM | juvenile Dermatomyositis |
| LCK | lymphocyte-specific protein tyrosine kinase |
| MAPK14 | mitogen-activated protein kinase 14 |
| MARP | muscle ankyrin repeat proteins |
| MBS | myosin binding subunit |
| MDA5 | melanoma differentiation-associated protein 5 |
| MDA5 ⁺ Patienten | Patienten mit Anti-MDA5 Autoantikörpern |
| MHC | major histocompatibility complex |
| Mi-2 ⁺ Patienten | Patienten mit Anti-Mi-2 Autoantikörpern |
| MLCP | myosin light-chain phosphatase |
| MPC | Myosin Phosphatase Komplex |
| MPRIIP | myosin phosphatase Rho interacting protein |
| MS | Multiple Sklerose |
| MSA | Myositis-spezifische Autoantikörper |
| MUC16 | Mucin 16 |
| NDC | non-disease-controls, Non-Disease Controls |
| NSCLC | non-small cell lung cancer |
| NuRD | Nucleosome Remodelling Deacetylase |
| PAMPS | (Pathogen-associated molecular patterns |
| PBC | primär biliäre Cholangitis |
| PD1 | Programmed Cell Death 1 |

| | |
|---------------------------------------|--|
| pDC | plasmazytoide dendritische Zellen |
| PD-L1 | Programmed Cell Death Ligand 1 |
| PD-L2 | Programmed Cell Death Ligand 2 |
| PFA | perifaszikuläre Atrophie |
| PFN | perifaszikuläre Nekrose |
| PI3K/AKT | phosphoinositide 3-kinase/Akt |
| PI3Ks | phosphoinositide-3-kinases |
| PRR | Pattern Recognition Rezeptor |
| PRSS3 | serine protease 3 |
| qPCR | quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion |
| RA | rheumatoide Arthritis |
| RAI1 | retinoic acid induced 1 |
| RGPD8 | RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 8 |
| <i>RIG</i> | retinoic acid-inducible gene |
| rp-ILD | rapid progressive interstitial lung disease |
| RSV | respiratorisches Synzytial-Virus |
| SLE | Systemischer Lupus Erythematoses |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism |
| SSc | sekundär sklerosierende Cholangitis |
| ssDNA | double-stranded DNA |
| STAT | Signal transducer and activator of transcription |
| SYTL1 | Synaptotagmin Like 1 |
| T1D | Typ 1 Diabetes Mellitus |
| TCR | T-Zell-Rezeptor |
| TFPI-2 | tissue factor pathway inhibitor-2 |
| TGF- β | transforming growth factor- β |
| TIF-1 γ | transcriptional intermediary factor-1gamma |
| TIF-1 γ ⁺ Patienten | Patienten mit Anti-TIF-1 γ Autoantikörpern |
| TLR | Toll-Like Rezeptoren |
| USF3 | upstream transcription factor family member 3 |
| USP17L10 | ubiquitin specific peptidase 17 like family member 10 |
| VSMC | vascular smooth muscle cells (vaskuläre glatte Muskelzellen) |
| WES | Whole Exome Sequencing |

Abstract

Dermatomyositis (DM) is a rare autoimmune disease which belongs to the idiopathic inflammatory myopathies. It is characterized by a heterogeneous clinic and morphologic phenotype. The disease primarily affects the skin and the proximal skeletal muscles, however even internal organs can be involved. Myositis-specific autoantibodies (MSA) help distinguish between subgroups of DM harbouring unique phenotypes. The most common MSA include anti-Mi-2, anti-TIF-1 γ and anti-MDA5, all of which have been assessed in this thesis.

The etiopathogenetic mechanisms underlying DM are not fully understood to this day. One hypothesis postulates an increased interferon type 1 response, another assumes a dysregulated immune-checkpoint inhibition via PD1 and its ligands. The type 1 interferon hypothesis is substantiated by the distinct interferon type 1 signature that can be found in the muscle, blood and skin tissue of DM patients. Here we investigated if DM harbours a genetic component, and especially whether the hypothesis mentioned above have a genetic basis.

Firstly, using histological stainings, it could be shown that immune cells in muscle tissue of DM patients express PD1 and its ligands L1 and L2 on different levels depending on their autoantibodies. These findings were verified through qPCR.

In addition to that, various genetic changes were identified through WES analysis:

Genetic changes were observed in six genes belonging to the known interferon type 1 signature of DM patients (*HLA-DRB1*, *IFI44L* and others). Due to their rare occurrence in the general population these seem to play a primary role in the pathogenesis of DM.

Additionally, ten more genes could be recognized which appear in high frequency in the general population and can therefore be categorized as predisposition signature (*HLA-A*, *HLA-B*, *IFIH1*, *IFI16* and more).

Moreover, we could identify six additional genes which are part of the PD1 signalling pathway like *PIK3C2G* and *PIK3C3*.

Furthermore, a DM specific and auto-antibody specific signature could be identified: the DM specific genes consisted amongst others of *ANDKRD36*, *CNN2* and *MUC16*. The auto-antibody specific genes were comprised of *AGAP4*, *MPRIP*, *RAI1* and *CABP1* for anti-Mi-2⁺ patients, and *USF3* for anti-TIF-1 γ ⁺ patients. A change in the *USP17L10* gene could only be detected in subgroups of anti-Mi-2⁺ and anti-TIF-1 γ ⁺ patients .

Interestingly, eight identified genes were linked to the PI3K/AKT signalling pathway (*ANP32B*, *USF3*, *MET*, *SYTL1*, *PIK3C2G*, *PIK3C2B*, *PIK3C3*, *HRAS*).

In conclusion the data provides supporting evidence for both the interferon- as well as the immune checkpoint hypothesis. The PI3K/AKT signalling pathway seems to be a central pathway regulating the pathogenesis of DM.

Zusammenfassung

Die Dermatomyositis (DM) ist eine seltene Autoimmunerkrankung, die zu der Gruppe der idiopathischen inflammatorischen Myopathien gehört. Sie präsentiert sich mit einem heterogenen klinischen und morphologischen Krankheitsbild. Primär sind die Haut und proximale Skelettmuskulatur betroffen, doch auch innere Organe können betroffen sein. Auf der Basis myositis-spezifischer Autoantikörper (MSA) lassen sich distinkte Subgruppen der DM mit unterschiedlichem Phänotyp voneinander abgrenzen. Zu den häufigsten Autoantikörpern gehören Anti-Mi-2, Anti-TIF-1 γ und Anti-MDA5, welche auch in dieser Arbeit untersucht wurden.

Die ätiopathogenetischen Mechanismen, die der DM zugrunde liegen, sind bis *dato* noch nicht komplett verstanden. Eine Hypothese postuliert eine gesteigerte Interferonantwort, eine andere postuliert eine dysregulierte Immuncheckpoint-Inhibition über PD1 und dessen Liganden. Die „Typ I Interferon Hypothese“ wird untermauert durch die bekannte, distinkte Interferon Typ 1 Signatur, die im Muskel, Blut und Hautgewebe von DM Patienten gefunden werden kann. In dieser Arbeit wurde auf verschiedenen Wegen untersucht, ob die DM eine genetische Grundlage besitzt, insbesondere ob oben genannte Hypothesen auf einer genetischen Basis beruhen.

Zunächst konnte auf histologischer Ebene gezeigt werden, dass Immunzellen im Muskelgewebe von DM Patienten PD1 und dessen Liganden L1 und L2 exprimieren und die Expressionslevel vom Autoantikörper abhängen. Diese Entdeckung konnte mittels qPCR bestätigt werden.

Durch eine Analyse mittels WES konnten anschließend verschiedenste Mutationen gefunden werden:

Genetische Veränderungen fanden sich in sechs Genen, die zur bekannten Interferon Typ 1 Signatur von DM Patienten gehören (*HLA-DRB1*, *IFI44L* und andere). Diese scheinen aufgrund ihres seltenen Vorkommen in der Allgemeinbevölkerung eine primäre Rolle für die Krankheitsentstehung von DM zu spielen. Darüber hinaus gehend fanden sich zehn Gene, die durch ein häufiges Auftreten in der Allgemeinbevölkerung

gekennzeichnet waren und daher eher als Prädispositions-Signatur gesehen werden können (unter anderem *HLA-A*, *HLA-B*, *IFIH1*, *IFI16*).

Zusätzlich konnten sechs veränderte Gene gefunden werden, die Teil des PD1 Signalweges sind, wie *PIK3C2G* und *PIK3C3*.

Auch eine DM spezifische und Autoantikörper-spezifische Signatur konnte identifiziert werden: unter die DM spezifischen Gene fielen unter anderem *ANKRD36*, *CNN2* und *MUC16*. Unter die Autoantikörper-spezifischen Gene *AGAP4*, *MPRIP*, *RAI1* und *CABP1* für die Anti-Mi-2⁺ DM Patienten, und *USF3* für Anti-TIF-1 γ ⁺ Patienten, eine weitere Veränderung im Gen *USP17L10* war nur in den beiden Autoantikörpergruppen von Anti-Mi-2⁺ und Anti-TIF-1 γ ⁺ Patienten detektierbar.

Interessanterweise fand sich bei acht Genen ein Zusammenhang mit dem PI3K/AKT Signalweg (*ANP32B*, *USF3*, *MET*, *SYTL1*, *PIK3C2G*, *PIK3C2B*, *PIK3C3*, *HRAS*).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Daten sowohl die Interferon- als auch die Immuncheckpoint-Hypothese unterstützen, wobei ein zentraler Signalweg in der Pathogenese über PI3K/AKT reguliert zu werden scheint.

1. Einführung

Die Dermatomyositiden (DM) sind seltene, systemische Autoimmunerkrankungen, die zu den idiopathischen inflammatorischen Myopathien gehören. Sie präsentieren sich mit einem heterogenen klinischen und morphologischen Erscheinungsbild. Die DM betreffen primär die Haut und proximale Skelettmuskulatur, aber auch verschiedene innere Organe, wie zum Beispiel Lunge, Darm, Herz oder Gefäße.

Es existieren unterschiedliche Manifestationsformen dieser Erkrankung und sie variieren unter anderem abhängig von Alter, Geschlecht und Ethnizität. So lässt sich zum Beispiel die juvenile DM (jDM), definiert durch einen Krankheitsbeginn vor dem sechzehnten Lebensjahr, von der adulten DM (aDM) abgrenzen; beide zeigen deutliche Unterschiede in Bezug auf klinische Charakteristika und typische assoziierte Komplikationen voneinander (1). Die jDM präsentiert sich nicht selten mit einem chronischen Verlauf bei relativer Therapieresistenz und einem damit erhöhten Risiko von dauerhaften Schäden, charakterisiert beispielsweise durch Skelettmuskelatrophie oder Verkalkungen der Muskelfasern (2, 3). Sie kann jedoch auch hoch akut ablaufen, zu massiven Hautschwellungen führen, Blutungen in inneren Organen (Gastrointestinaltrakt) und Organversagen (zum Beispiel Niereninsuffizienz) nach sich ziehen. Patienten mit aDM können im Gegensatz zu Patienten mit jDM ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Malignoms oder auch eine schwere Lungenbeteiligung, in Form einer Interstitial Lung Disease (ILD) aufweisen (4).

Anhand von Autoantikörpern, den sogenannten Myositis-spezifischen Autoantikörpern (MSA), können distinkte Subgruppen der DM voneinander abgegrenzt werden (5, 6). Diese Subgruppen zeigen unterschiedliche klinische Manifestationen und Prognosen. Daher benötigen sie ein spezifisches klinisches und therapeutisches Management. MSA richten sich gegen intrazelluläre Bestandteile wie etwa dem Mi-2-Protein, eine Komponente des Nucleosome Remodelling Deacetylase (NuRD) Komplexes. Bei etwa 70% aller Patienten mit Dermatomyositis lassen sich MSA nachweisen (7, 8). Nachstehend werden die in dieser Arbeit verwendeten MSA näher beschrieben.

1.1. Myositis-spezifische Antikörper

1.1.1. Anti-Mi-2 Antikörper

Das Mi-2 Protein ist ein Teil des NuRD Komplexes, der für die Regulierung der Transkription zuständig ist (9). Mi-2 konnte 1976 als erstes Antigen mit einer Myositis in Verbindung gebracht werden (10), kurz nachdem im Jahr 1975 eine der ersten Klassifizierungen für DM durch Bohan und Peter veröffentlicht wurde (11, 12). 1985 konnte dann erstmals ein Anti-Mi-2 Autoantikörper identifiziert werden (13).

Klinisch sind bei DM-Patienten mit Anti-Mi-2 Autoantikörpern (in Folge als Mi-2⁺ Patienten bezeichnet) typische Hautläsionen zu beobachten, wie Gottron Papeln, ein heliotropes Erythem auf den Augenlidern und ein Ausschlag auf Dekolleté, Schultern, Wangen, Oberarmen und Oberschenkeln. Typischerweise zeigt sich eine schwere proximale Muskelschwäche. Die Höhe des Anti-Mi-2 Antikörper (AK) Titers korreliert mit der Schwere der Muskelschwäche und kann sich nach Remission normalisieren (14).

Eine Beteiligung anderer Organe ist nicht häufig. Bei Diagnosestellung findet sich meist ein stark erhöhter Kreatinkinase (CK) Titer. Mi-2⁺ Patienten sprechen gut auf Kortikosteroide (6) und Rituximab (15) an. Das Auftreten von Anti-Mi-2 ist meist mit einer guten Prognose verbunden.

Bis auf weiteres ist der Zusammenhang von Anti-Mi-2 AK und Neoplasien unklar. In einigen Studien zeigt sich ein gering erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Malignoms (14, 16), in anderen kann eine solche Assoziation nicht festgestellt werden (13, 15, 17, 18).

Histologische Eigenschaften bei Mi-2⁺ Patienten DM-Patienten sind charakteristisch und äußern sich vor allem in einer schweren Skelettmuskelbeteiligung. Typischerweise findet man Muskelfasern, die sich stark in ihrer Größe unterscheiden. Auffällig ist auch die ausgeprägte perifaszikuläre Atrophie (PFA). Nekrotische Fasern finden sich entweder einzeln oder in kleinen Gruppen angeordnet. Meist sieht man eine starke Entzündungsreaktion, diffus verteilt, dominant im Perimysium und gering im Endomysium, wobei sich die Infiltrate aus Lymphozyten oder Makrophagen zusammensetzen. Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I Expression sarkolemmal hebt die Muskelatrophie in perifaszikulären Bereichen hervor, wobei sich ein abnehmender Gradient zum Zentrum des Faszikels hin zeigt. Eine gering ausgeprägte MHC Klasse II Überexpression findet sich perifaszikulär sarkolemmal und um Entzündungsinfiltrate herum. Die T-Zell-Population besteht aus CD4⁺ und CD8⁺

Zellen. Vereinzelt finden sich auch B-Zellen und Plasmazellen. Komplementablagerungen (zum Beispiel C5b-9) lassen sich kräftig auf dem Sarkolemm vieler perifaszikulär gelegener Fasern nachweisen, seltener auf einigen Kapillaren.

1.1.2. Anti-TIF-1 γ Antikörper

TIF-1 γ ist ein intranukleäres Protein, das eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung und Karzinogenese spielt (19). Als Mitglied der TIF-1 Familie ist es ein Transkriptionskofaktor im transforming growth factor- β (TGF- β) Signalweg (20). Anti-transcriptional intermediary factor-1gamma (TIF-1 γ) wurde 2006 erstmals identifiziert (19).

Klinisch präsentieren sich Patienten mit Anti-TIF-1 γ Autoantikörpern (in Folge als TIF-1 γ^+ Patienten bezeichnet) typischerweise mit einer proximalen Extremitätenschwäche begleitet von Hautmanifestationen. Diese Effloreszenzen sind meist stärker ausgeprägt und weiter ausgebreitet im Vergleich zu anderen DM Subgruppen (21). Darüber hinaus kann eine auffällige Dysphagie beobachtet werden (22). Andere extramuskuläre Manifestationen sind weniger häufig als zum Beispiel bei Patienten mit Anti-MDA5-Autoantikörpern (Melanoma Differentiation-associated Protein 5, MDA5). ILD und markante Arthralgien kommen bei Anti-TIF-1 γ , im Kontrast zu Anti-MDA, meist nicht vor. Das Vorkommen von Anti-TIF-1 γ AK bei adulten Patienten mit DM ist eindeutig mit dem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Malignomen assoziiert (6, 23, 24). Patienten über 40 Jahren können in circa 50% der Fälle eine Neoplasie etwa 3 Jahre vor oder nach Diagnosestellung entwickeln (23). Bei der juvenilen DM besteht allerdings keine Assoziation zwischen diesem AK und einem erhöhten Risiko für Malignome. Eine Erklärung für den Zusammenhang zwischen Malignität und Anti-TIF-1 γ AK könnte das Vorhandensein von somatischen Mutationen in Tumor-TIF1 Genen (*TRIM33*, *TRIM24*, *TRIM28* und *TRIM66*) sein (25).

Muskelbiopsien von TIF-1 γ^+ Patienten DM-Patienten zeigen ein starkes Ödem mit PFA und regionalem Kapillarverlust. Die wichtigste Veränderung ist eine auffällige Komplementablagerung (zum Beispiel C5b-9) auf einer Vielzahl von Kapillaren, welche mit dem Vorhandensein oder der Entwicklung eines Malignoms in Zusammenhang gebracht werden konnte (22).

Das Entzündungsinfiltrat besteht aus überwiegend Makrophagen, welche sich diffus verteilt prädominant im Perimysium und Endomysium befinden. Im Endomysium zeigt

sich meist eine geringe Anzahl an CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, manchmal gruppieren sich diese Zellen auch locker um perimysiale Gefäße, ohne eine angio-destruktive Vaskulitis zu verursachen. B-Zellen und Plasmazellen sind selten detektierbar. Nekrotische Fasern sind selten. MHC Klasse I wird auf perifaszikulären atrophen Muskelfasern und auf dem Sarkolemm zentrofazikulär gelegener Fasern stark überexprimiert. MHC Klasse II ist in aller Regel auf dem Sarkolemm perifaszikulärer Fasern negativ.

1.1.3. Anti-MDA5 Antikörper

MDA5, zunächst als CADM-140 Antigen bezeichnet, ist eine zytoplasmatische RNA-spezifische Helikase, die zur Familie der retinoic acid-inducible gene (*RIG*) I-like Rezeptoren gehört (26). Diese sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und wesentlich für die Erkennung von Virus-RNA (27).

Patienten mit Anti-MDA5 Autoantikörpern (in Folge als MDA5⁺ Patienten bezeichnet) präsentieren sich charakteristisch mit einem schweren Krankheitsbild in 30-50% der Fälle, welches sich deutlich von dem klinischen Phänotyp von Mi-2⁺ Patienten und TIF-1 γ ⁺ Patienten unterscheidet. Geprägt wird jenes Anti-MDA5-Krankheitsbild von extramuskulären Symptomen, hervorgerufen durch ILD, Hautulzera, meist an Extremitäten, und häufig auftretenden Arthritiden. Diese schwere Krankheitsaktivität steht im Kontrast zur milden bis moderaten Muskelschwäche, die typischerweise die proximalen oberen Extremitäten betrifft.

Neben klassischen DM Effloreszenzen, welche bei MDA5⁺ Patienten selten auftreten, zeigen diese Patienten Hautmanifestationen wie Ulzera, digitale Nekrosen, palmare Papeln oder Mechanikerhände (28). Häufig leiden Patienten auch an Arthralgien oder Polyarthritis, die Ähnlichkeiten zu rheumatoider Arthritis aufweisen. Die schwer verlaufende ILD ist einer der häufigsten extramuskulären Manifestationen und die relevanteste Begleiterkrankung (29). Durch das rasche Voranschreiten einer ILD wird im Verlauf nicht selten eine intensivstationäre Behandlung notwendig. Die frühzeitige Diagnosestellung einer ILD ist wichtig, da diese für die hohe Mortalitätsrate von bis zu 20% verantwortlich ist (23).

Bei Muskelbiopsien von MDA5⁺ Patienten DM-Patienten zeigen sich nicht die typischen morphologischen Veränderungen der DM, wie eine prominente Muskelfaseratrophie, Kapillarverlust oder eine starke MHC Klasse I Überexpression (30). Stattdessen findet sich eine nur milde Expression von MHC Klasse I auf dem Sarkolemm einzelner Muskelfasern. Muskelfasernekrosen sind nicht auffindbar. MHC Klasse II ist nicht

nachzuweisen. Entzündungsinfiltrate fehlen oder sind selten zu finden, wenn vorhanden dann meist fokal um Gefäße im Perimysium angeordnet. Zumeist bestehen diese Infiltrate aus Makrophagen und isolierten T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen sind nicht erkennbar. Komplementablagerungen (zum Beispiel C5b-9) auf dem Sarkolemm oder auf Kapillaren können fokal vorkommen oder auch fehlen.

Für eine Zusammenfassung der verschiedenen hier untersuchten DM Phänotypen siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Phänotypen des Dermatomyositis Spektrums

| Klinischer Phänotyp | Anti-Mi-2 | Anti-TIF1γ | Anti-MDA5 |
|---------------------------------|-----------------------------------|--|--|
| Muskelschwäche | Schwere, proximale Muskelschwäche | proximale Muskelschwäche | keine/milde proximale Muskelschwäche |
| Hautmanifestation | typischer DM Ausschlag | typischer DM Ausschlag/ generalisiertes Erythem | Ulzera an Extremitäten, digitale Nekrosen |
| Calcinosis cutis | - | - | + |
| ILD | - | - | +++ |
| Morphologischer Phänotyp | Anti-Mi-2 | Anti-TIF1γ | Anti-MDA5 |
| Muskelbeteiligung | +++ | +++ | +/- |
| PFA | +++ | +++ | +/- |
| Perifaszikuläre Nekrose (PFN) | einzel, gruppiert | - | - |
| Lymphozyteninfiltrate | dicht | gering | minimal perivaskulär |
| MHC I | perifaszikulär | perifaszikulär | mild, perifaszikulär |
| MHC II | + | - | - |
| Komplementablagerungen (C5b9) | Sarkolemm | Kapillaren | -/Sarkolemm |
| Assoziation zu Malignom | +/-? (ca. 20-30%) | +++ (über 50%) | ca. 20% |

1.2. Zwei Hypothesen zur Krankheitsentstehung

Die genauen pathogenetischen Mechanismen, die der DM zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig verstanden. Neben dem adaptiven und dem humoralen Immunsystem spielen Typ 1 Interferone eine zentrale Rolle in der Krankheitsentstehung (31). Im Folgenden soll auf Hypothesen der Pathogenese näher eingegangen werden.

1.2.1. Interferon-Hypothese

Typ 1 Interferone sind Zytokine, die in zahlreiche Formen der Immunantwort involviert sind. Die Bindung von Typ 1 Interferonen an ihren Rezeptor (type 1 interferon receptor, IFNAR) an den Zielzellen führt über die Aktivierung des JAK/STAT Signalweges zur Expression einer Vielzahl an Genen, den Typ 1 Interferon-stimulierten Genen (ISG) (32). Diese Gene werden in ihrer Gesamtheit auch als Interferon Typ 1 Signatur bezeichnet (im Folgenden nur als Interferon-Signatur genannt). Daraus resultiert die Produktion der Proteine, die durch ISG kodiert werden, wie zum Beispiel MxA oder ISG15, welche wesentliche Bestandteile der intrazellulären Abwehr unter anderem gegen virale Infektionen sind; ihre Wirkung entfalten diese indem sie beispielsweise die virale Replikation beeinträchtigen (33). Eine dauerhafte Aktivierung von Typ 1 Interferonen ist jedoch zytotoxisch (34) und kann zur Akkumulation von Zellbestandteilen führen, welche eine potentielle Quelle für Autoantigene darstellen kann.

Forschungen auf Transkriptomebene, die an Biopsien von Skelettmuskeln von an DM erkrankten Patienten durchgeführt wurden, konnten eine bestimmte, spezifische Überexpression von multiplen ISG zeigen und suggerierten damit die Bedeutung dieser Interferone für den Pathomechanismus der DM (31, 35). Immunhistologisch konnte bewiesen werden, dass in perimysialen perifaszikulären atrophischen Muskelfasern einige Typ 1 Interferon-induzierte Proteine, wie MXA, ISG15, IRF7 enthalten sind (36). Aber auch RIG1, ein intrazellulärer Rezeptor des angeborenen Immunsystems, und RSAD2 akkumulieren dort (35). Die Expression einiger Interferon-induzierter Gene, wie *MX1* oder *ISG15* in Muskelzellen der perifaszikulären Region und auf Kapillaren konnte außerdem auf Proteinebene bestätigt werden (37, 38).

Die Überproduktion dieser IFN-induzierten Transkripte und Proteine im Muskel von Patienten wurde lange als einzigartig und pathognomonisch für DM verglichen mit anderen Muskelerkrankungen angenommen (31, 36, 39).

Neuere Studien zeigen, dass IFN-1 Signalwege nicht nur bei Patienten mit DM aktiviert sind, sondern auch bei Patienten mit Antisynthetase Syndrom (ASyS), immun-medierter nekrotisierender Myopathie (IMNM) und Einschlusskörper-Myositis (inclusion-body myositis, IBM) (37). Quantitativ und qualitativ war die Aktivierung dieses Signalweges jedoch eindeutig different zwischen Patienten mit DM verglichen mit Patienten mit ASyS, IBM oder IMNM (37).

Patienten mit DM weisen auch erhöhte Level von zirkulierenden IFN-1 Zytokinen, wie IFN- α und IFN- β auf (40, 41). Die Expression von IFN induzierten Genen bei DM scheint vor allem auf IFN- β zurückzuführen zu sein, da vorrangig dieses, und weniger IFN- α , im Blut von Patienten erhöht ist (40).

Inflammatorische Infiltrate, vorwiegend im Perimysium, Ischämie infolge von „Vaskulopathie“ und pathognomonische perifaszikuläre Muskelfaseratrophie sind anerkannte histologische Charakteristika der DM (42, 43). Unklar ist jedoch ihre ätiopathogenetische Relevanz und inwieweit diese voneinander abhängen (3). Eine hypoxische Genese ist viele Jahre ebenfalls intensiv beforscht worden (44, 45), steht in dieser Doktorarbeit jedoch nicht im Zentrum.

Neueren Ergebnissen zufolge scheinen Interferon-assoziierte Moleküle einen wesentlichen Beitrag zur Ausbildung dieser histologischen Merkmale, der perifaszikulären Atrophie und den endothelialen tubuloretikulären Formationen zu leisten (31, 35, 44, 46-49). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Erhöhung der IFN-induzierten Proteine sich überwiegend bei jenen Patienten mit DM zeigt, die eine PFA in ihren Muskelbiopsien aufwiesen (38). Eine Hochregulierung von Biomarkern, die zum Interferon 1 Signalweg gehören, konnte insgesamt im Muskelgewebe (31, 35, 36, 46, 50-52), in der Haut (53) und im Blut (52, 54, 55) von Patienten mit DM detektiert werden.

Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die kutane Krankheitsaktivität, gemessen durch den Cutaneous Dermatomyositis Disease Area and Severity Index (CDASI), von DM mit erhöhten Serumwerten von IFN- β und der Expression von ISG im Blut korreliert.(56)

Sowohl die globale als auch die kutane Krankheitsaktivität korreliert positiv mit den Levels der Interferon-induzierten Gene im Blut (40, 52, 54, 56), wobei die kutane Krankheitsaktivität vor allem mit den IFN- β Proteinlevels korreliert (56).

Quelle des Typ 1 Interferons können plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) aber auch andere antigenpräsentierende Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen zu sein. Diese produzieren große Mengen von Typ 1 Interferonen, infiltrieren das Muskelgewebe (31, 57) und die Haut (58-60) von DM Patienten und dürften somit eine zentrale Rolle in der Pathogenese der DM spielen, speziell in der Entwicklung der perifaszikulären Atrophie (36).

Vielfach wird diskutiert, wie es zu der gestörten Interferon-1-Antwort bei Patienten mit DM kommt. Dabei liefert eine Gruppe von Erkrankungen einen besonderen Hinweis: bei den monogenetischen Typ 1 Interferonopathien handelt es sich um eine Reihe heterogener autoinflammatorischen Erkrankungen, die auf einer dysfunktionalen Interferon-1-Antwort beruhen. Verursacht werden diese Typ 1 Interferonopathien durch Mutationen in verschiedenen Genen wie etwa von Rezeptoren, die für das Erkennen von pathogenen Nukleinsäuren verantwortlich sind, von Mutationen in downstream-Mediatoren dieser Rezeptoren oder auch von Mutationen in Genen, die in den Metabolismus von Nukleinsäuren involviert sind. (61)

Insgesamt nimmt man an, dass die Aktivierung des Interferon-1-Signalwegs entweder Folge einer ständigen Aktivierung dieser Rezeptoren oder Mediatoren ist oder durch eine Akkumulation von Nukleinsäuren, welche von endogenen Retroelementen stammen, entsteht (62). Patienten mit Typ 1 Interferonopathien präsentieren sich oft früh in der Entwicklung durch ein breites Spektrum von Symptomen, das von systemischer Autoinflammation bis hin zu distinkten, organ-spezifischen Manifestationen, die zumeist das Gehirn oder die Haut betreffen, reicht (63). Auch die seltene Form des Familiären Systemischen Lupus Erythematodes gehört zu den Typ 1 Interferonopathien (61, 64). Einige der Gene, die bei Patienten mit Typ 1 Interferonopathien mutiert sind, gehören interessanterweise zu der bei DM bekannten Interferon-Signatur, wie etwa *ADAR*, *IFIH1*, *ISG15*, *TREX1*, oder *DDX58* (61, 65).

In Zusammenschau dieser Ergebnisse, der Hochregulierung von ISG, die mit einer Überexpression der korrespondierenden Proteine in veränderten Muskelfasern korreliert, wurde die Hypothese aufgestellt, dass ebendiese Muskelfasern Ursprung der ISG und der Interferon-assoziierten Moleküle seien und die Veränderung der Muskelfasern direkt mit der Aktivierung von IFN Typ 1 und nachfolgenden Signalwegen, welche durch IFN Typ 1 aktiviert wurden, zusammenhängt. Der Tatsache geschuldet, dass es bekannte Erkrankungen gibt, die aufgrund einer genetischen Mutation zu einer gesteigerten Interferon Typ 1 Antwort führen (wenngleich diese nicht DM-assoziierte Symptome haben), wurde darüber hinaus die Hypothese aufgestellt, dass auch Patienten mit DM eine genetische Grundlage besitzen könnten. Ziel der Forschung im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte daher sein, zu untersuchen, ob Patienten mit DM eine genetische Prädisposition zur gesteigerten Interferonantwort aufweisen.

1.2.2. Immuncheckpoint-Hypothese

Eine weitere Hypothese beschäftigt sich mit einem anderen Regulationsweg des Immunsystems und den beteiligten Immuncheckpoint-Regulatoren: Das Immunsystem des Menschen wird durch eine filigrane Balance zwischen Co-stimulierenden und Co-inhibierenden Molekülen gesteuert. Autoimmunität kann in diesem System auf verschiedenen Wegen entstehen: entweder durch eine exzessive Co-Stimulation oder eine unzureichende Co-Inhibition kann die Aktivierung und Proliferation von autoreaktiven Zellen induziert und damit die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung begünstigt werden. Immunantworten werden daher effektiv über eine Reihe von sogenannten Prüfstellen, „immune-checkpoints“, kontrolliert (66).

Das Immunsystem des Menschen hat im Laufe der Zeit viele Mechanismen entwickelt, um die Entstehung autoimmuner Reaktionen zu verhindern: Autoreaktiv veränderte T-Zellen etwa werden durch mindestens zwei Kontrollmechanismen streng reguliert (67). Der erste wird als zentrale Toleranz bezeichnet: aktiviert durch T-Zellen, die einen T-Zell-Rezeptor (TCR) mit einer hohen Affinität zu sogenannten „Eigenpeptiden“ exprimieren, werden diese durch negative Selektion im Thymus eliminiert. Der zweite Mechanismus wird als periphere Toleranz bezeichnet und wird durch immunregulatorische Zellen induziert, wie regulatorische T Zellen, regulatorische B-Zellen und tolerogene dendritische Zellen (DC) (68). Die Aktivierung von reaktiven T-Zellen erfolgt durch professionell Antigen präsentierende Zellen (professional antigen-presenting cells, APCs); um T-Zellen zu aktivieren, sind 3 Signale notwendig: die Bindung des TCR mit exprimiertem Autoantigen an Moleküle des MHC, co-stimulatorische Signale sowie von APCs exprimierte Zytokine (69, 70). Co-Inhibitorische Rezeptoren, wie Programmed Cell Death 1 (PD1) oder Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA-4), werden induziert, um eine exzessive T-Zell Aktivierung zu regulieren und eine Immunreaktion gegen Autoantigene zu stoppen (70).

PD1 gehört zur Familie der CD28 Moleküle und wird auf der Oberfläche einer Reihe von aktivierten Immunzellen exprimiert, wie auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen, regulatorischen T-Zellen, Natürlichen Killerzellen, aktivierten Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen (66).

Im Falle des PD1 handelt es sich um einen negativen Regulator der adaptiven Immunität, der die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen durch Bindung von PD1 an die Liganden L1 und L2 limitiert, somit die Immunantwort beendet und eine überschießende Reaktion

des Immunsystems verhindert (66). Nach einer TCR-Aktivierung kommt es zu einer frühen Hochregulierung von PD1, welche allerdings nicht immer mit einer T-Zell-Dysfunktion assoziiert ist (71).

Der Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) befindet sich auf APCs wie Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen. Die Expression von PD-L1 kann allerdings auch auf der Oberfläche nicht-hämatopoetischer Zellen, wie vaskulären Endothelzellen, Inselzellen des Pankreas oder Zellen der Plazenta und Hoden erfolgen (72). Die Anwesenheit von PD-L1 auf peripheren Geweben ist grundlegend, insbesondere um dort autoimmune Schäden zu verhindern (66).

Programmed Cell Death Ligand 2 (PD-L2) zeigt ein anderes Expressionsmuster, scheint bis *dato* aber die gleiche inhibitorische Funktion wie PD-L1 zu übernehmen. So ist PD-L2 auf APCs, wie Makrophagen, myeloischen dendritischen Zellen und auf nicht-hämatopoetischen Geweben lokalisiert (73). Ihre Wirkung entfalten PD1, PD-L1 und PD-L2 indem sie verschiedene Signaltransduktionen blockieren. So wird unter anderem der Phosphoinositid-3-Kinase/Akt (PI3K/AKT)- Signalweg, die Phosphorylierung von ZAP70 oder aber die Funktion der Leukozyten spezifischen Tyrosinkinase (LCK) inhibiert; daraus resultiert die Unterdrückung des TCR-Signalweges (66).

1.2.3. Der PD1 Signalweg als Grundlage autoimmuner Reaktionen in DM

Die Beteiligung von Immuncheckpoints bei Autoimmunität konnte für einige Erkrankungen zum Beispiel Systemischer Lupus Erythematoses (SLE), rheumatoide Arthritis (RA), Multiple Sklerose (MS) und Typ 1 Diabetes Mellitus (T1D) bereits gezeigt werden (70, 74-78). Das Vorliegen von Single Nucleotide Polymorphismen von PD1, PD-L1 und PD-L2 wurden für SLE, die ankylosierende Spondylitis, RA und T1D beschrieben (79). Eine krankheitsfördernde Rolle des PD1 Signalweges gilt in vielen weiteren Autoimmunerkrankungen, wie der Inflammatory Bowel Disease (IBD) (80, 81), Autoimmunhepatitis (AIH) (82), primär biliären Cholangitis (PBC) (82), Psoriasis (83, 84) und Sjögren Syndrom (85) als erwiesen.

Erste Hinweise, dass eine Veränderung im PD1 Signalweg auch bei Patienten mit Myositiden vorliegen könnte, ergaben sich durch das vermehrte Auftreten von unerwünschten Ereignissen (hier akute Entwicklung einer Myositis) in Zusammenhang von Immuntherapien (immuno-therapy-related adverse events, irAEs) mit Immuncheckpoint-Inhibitoren bei Krebspatienten.

Immuncheckpoint-Inhibitoren, humanisierte monoklonale Immunglobulin G4 Antikörper (IgG4), stellen eine neue, vielversprechende Klasse von Tumorthapeutika dar und haben das Ziel die körpereigene Antitumor-Immunität zu stärken, indem sie negative Regulatoren wie PD1 inhibieren und somit die Aktivierung von CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen fördern; sie haben sich als eine sehr effektive Therapieform bei Patienten mit Melanom und Nicht-Kleinzelligem Lungen-Karzinom (non-small cell lung cancer, NSCLC) erwiesen (86-88). Patienten, die mit den Immuncheckpoint-Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab - beide anti-PD1 wirksam - behandelt wurden, wiesen in mehr als einem Drittel der Fälle kutane irAEs, in Form von makulopapulösen Exanthemen, Vitiligo oder induzierter Psoriasis auf (89-97). Einige Patienten entwickelten irAEs in Form einer Myositis (98-105) oder einer Myokarditis (106, 107). Patienten, die einer Behandlung von Ipilimumab, einem weiteren Immuncheckpoint-Inhibitor, unterliefen, zeigten in mehreren Fällen die klassischen kutanen Manifestationen einer DM (108, 109). Ipilimumab entfaltet seine Wirkung über die Inhibierung von CTLA-4, einem Rezeptor auf T-Helfer-Zellen.

Bei genauerer Untersuchung der Skelettmuskelbiopsien von Patienten mit durch Immuncheckpoint-Inhibitor induzierter Myositis (myositis induced by immune checkpoint inhibitor, irMyositis) konnten PD1⁺ T-Zellen sowie die Expression von PD-L1 auf CD68⁺ Makrophagen und die Expression von PD-L2 auf dem Sarkolemm von Muskelfasern festgestellt werden.(110)

PD1 ist der am höchsten exprimierte inhibitorische Rezeptor auf CD8⁺ Zellen während einer chronischen Entzündung und spielt eine wesentliche Rolle in der Regulierung des T-Zell-Phänotyps (110). In diesem Zusammenhang haben wir eine neue Hypothese zur Relevanz PD1-assoziiertes Signalweg für die DM entwickelt. Die Aktivierung des PD1 Signalweges könnte im Falle der DM dabei auf Mechanismen beruhen, die mit einer dysfunktionalen Aktivität von T-Zellen zusammenhängen. So können T-Zellen, die dauerhaft gegenüber einem Antigen exponiert sind, einen Prozess durchlaufen, der als T-Zell „Ermüdung“ (T-cell exhaustion) bezeichnet wird und von PD1 und dessen Liganden kontrolliert wird (111); andere bezeichnen die hochregulierte Expression von PD1 auf T Zellen als sogenannte „antigen-experienced T cells“. PD1 ist auf T-Zellen, die eine T-Zell-Stimulation durchgemacht haben, hochreguliert und kann daher als Marker für sogenannte „exhaustion“ oder „Antigen-experience“ bezeichnet werden (110, 112). Zusammengefasst denken wir also, dass diese T Zellen eine exzessive und dauerhafte/wiederholte Stimulation (durch Antigenkontakt) und eine im Verlauf daraus resultierende eingeschränkte Aktivität aufweisen (113).

Alle oben genannten Phänomene lassen die Vermutung zu, dass Patienten mit DM eine genetische Prädisposition zu einer Störung des PD1 Signalweges besitzen könnten, die zur sekundären Entstehung von Autoimmunität führt. Ein definiertes Ziel der Forschung im Rahmen meiner Doktorarbeit ist es, herauszufinden, ob Patienten mit DM eine genetische Prädisposition zu einem veränderten PD1 Signalweg aufweisen.

2. Material

Tabelle 2: Laborausrüstung

| Produkt | Firma/Händler |
|--|---|
| Gelelektrophoresekammer horizontal | Biozym Diagnostic GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Kryostat Cryo-Star Microm HM560 | Microm, Walldorf, Deutschland |
| MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| MicroAmp Optical Adhesive Film | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Microplate Reader TECAN Infinite 200 | Tecan, Grödig, Österreich |
| Multifuge SR3+ | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Olympus BX50 Mikroskop & DP25 Kamera | Olympus, Tokio, Japan |
| PCR Thermocycler Uno-Cycler | VWR, Darmstadt, Deutschland |
| Qubit® 3.0 Fluorometer | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Real-Time PCR System 7900 HZ | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Thermomixer compact 5350 | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Transluminator G:BOX Syngene | Syngene, Cambridge, England |
| Zeiss Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop | Zeiss, Göttingen, Deutschland |

Tabelle 3: Allgemeine Chemikalien

| Produkt | Firma/Händler |
|---|--|
| Aceton | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Agarose | SERVA, Heidelberg, Deutschland |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline mit/ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (PBS) | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Chloroform | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| EDTA | Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland |
| Eosin-Y | Brunschwig Chemie, Amsterdam, Niederlande |
| Ethanol | JT Baker, Center Valley, USA |
| Ethidiumbromid | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Glykogen | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Isopropanol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Mayers Hämatoxylin Lösung | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumchloridlösung | Fresenius, Schweinfurt, Deutschland |
| Natriumperchlorat Monohydrat | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Normales Eselserum | AbD Serotec, Raleigh, USA |
| Normales Ziegenserum | Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA |

| Produkt | Firma/Händler |
|---------------------------------------|--|
| Proteinase K | Roche, Mannheim, Deutschland |
| RNAse A | Roche, Mannheim, Deutschland |
| ROTI-HISTOKIT II Einschlussmittel | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| TAE-Puffer 10x | Appllichem, Darmstadt, Deutschland |
| Tissue Tek | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Xylol | JT Baker, Center Valley, USA |
| VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI | Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA |

Tabelle 4: Primäre Antikörper- Immunhistochemie

| Antigen | Klon | Verdünnung | Spezifität | Firma | Nummer |
|---------------|------------|-----------------|------------|---|--------------|
| BDCA2 | 10E6.1 | 1:50 | Maus | Merck, Darmstadt, Deutschland | #MABF94 |
| C5b-9 | aE11 | 1:200 | Maus | DAKO, Hamburg, Deutschland | M0777 |
| CD3 | polyklonal | 1:100 | Kaninchen | DAKO, Hamburg, Deutschland | A0452 |
| CD4 | SP35 | gebrauchsfertig | Kaninchen | ZYTOMED Systems GmbH, Bargeheide, Deutschland | 7ml 503-3351 |
| CD8 | 144B | 1:100 | Maus | DAKO, Hamburg, Deutschland | M7103 |
| CD11b | EP45 | 1:50 | Kaninchen | Quartett, Berlin, Deutschland | AC-0043RUO |
| CD20 | 144B | 1:200 | Maus | DAKO, Hamburg, Deutschland | M0755 |
| CD68 | EBM11 | 1:100 | Maus | DAKO, Hamburg, Deutschland | M0718 |
| CD123/ IL-3R | 6H6 | 1:100 | Maus | Antibodies-online.com, Aachen, Deutschland | ABIN1302506 |
| MHC Klasse I | W6/32 | 1:1000 | Maus | DAKO, Hamburg, Deutschland | M0736 |
| MHC Klasse II | CR3/43 | 1:100 | Maus | DAKO, Hamburg, Deutschland | M0770 |
| PD1 | NAT105 | 1:100 | Maus | Abcam, Cambridge, England | ab52587 |
| PD-L1 | E1L3N | 1:100 | Kaninchen | Cell Signaling, Frankfurt/Main, Deutschland | #13684 |
| PD-L2 | TY25 | 1:100 | Ratte | Abcam, Cambridge, England | ab21107 |

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper- Immunhistochemie

| Sekundäre Antikörper | Spezifität | Verdünnung | Firma |
|----------------------|----------------------|------------|---|
| Cy3 | Ziege anti Maus | 1:100 | Dianova, Hamburg, Deutschland |
| Cy3 | Ziege anti Hase | 1:100 | Dianova, Hamburg, Deutschland |
| Cy3 | Esel anti Ratte | 1:100 | Dianova, Hamburg, Deutschland |
| AF488 | Ziege anti Maus | 1:100 | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| AF488 | Ziege anti Ratte | 1:100 | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| AF488 | Ziege anti Kaninchen | 1:100 | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland |

Tabelle 6: Kommerzielle Kits

| Produkt | Firma/Händler |
|---------------------------------------|--|
| 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 | VWR, Darmstadt, Deutschland |
| Qubit® dsDNA BR Assay Kit | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Qubit® Assay Tubes | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix | Applied Biosystems, Foster City, USA |

Tabelle 7: PCR Sonden FIRMA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

| TaqMan® Gene Expression Assays | Referenznummer |
|--------------------------------|----------------|
| <i>PD1</i> | Hs01550088_ml |
| <i>PDL1</i> | Hs00204257_ml |
| <i>PDL2</i> | Hs00228839_ml |
| <i>PGK1</i> | Hs99999906_ml |

3. Methoden

Bei allen Versuchen und der Verfassung der Doktorarbeit wurden die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ eingehalten. Das Projekt ist von der Ethikkommission der Charité unter der Nummer EA1/204/11 bewilligt worden, für die genetischen Aspekte liegt die Bewilligung unter der Nummer EA2/107/14 vor.

3.1. Patienten und Muskelbiopsien

Insgesamt wurden 37 Skelettmuskelbiopsien von 36 Patienten mit diagnostizierter Dermatomyositis (DM), sowie sieben Muskelbiopsien von Patienten, die als Vergleichskontrollen (NDC – non-disease controls) dienten, retrospektiv untersucht. Die Muskelbiopsien waren aus diagnostischen Gründen entnommen worden. Einschlusskriterien für DM Patienten war eine typische Histologie in der Muskelbiopsie. Die Seren der Patienten wurden auf die Anwesenheit von Anti-Mi-2, -TIF-1 γ und -MDA-5 Autoantikörper überprüft. Nach den AK-Tests wurden folgende Patientengruppen untersucht: Mi-2⁺ Patienten (n=14), TIF-1 γ ⁺ Patienten (n=13), MDA5⁺ Patienten (n=9). In der Gruppe der MDA5⁺ Patienten wurden von einem Patienten zwei Muskelbiopsien untersucht, die in einem Abstand von drei Jahren entnommen worden waren. Ausschlusskriterien waren eine DM-untypische Morphologie, Positivität für mehr als einen AK und eine schlechte Qualität der Skelettmuskelbiopsien.

Normalkontrollen (Non-Disease Controls, NDC) stammten von neurologisch gesunden Patienten ohne histologische Auffälligkeiten. Die Muskelbiopsien waren wegen diffusen, unspezifischen Beschwerden entnommen worden. Kein Patient zeigte Auffälligkeiten in muskelrelevanten Parametern wie Auto-AK, CK-Level, LDH oder Transaminasen. Alle Biopsien wurden sofort nach Entnahme und diagnostischer Aufarbeitung bei -80°C kryokonserviert.

Folgende klinische Charakteristika der Patienten wurden dokumentiert: epidemiologische Daten, Lokalisation der Biopsie, Präsenz von Muskelschwäche oder Muskelschmerzen, CK-Level, Präsenz von typischen DM-Hautläsionen, ILD, die Assoziation zu Krebserkrankungen, das Therapieregime und das klinische Outcome.

3.2. Histologie

Alle Färbungen wurden an 7µm dünnen Schnitten durchgeführt, die mit Hilfe des Kryostat Cryo-Star Microm HM560 hergestellt wurden. Die Schnitte wurden auf silanisierte Glasobjektträger aufgebracht und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert. Alle Färbungen wurden gemäß standardisierten Protokollen durchgeführt.

3.2.1. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbemethode ermöglicht die Identifikation und selektive Darstellung von Gewebestrukturen, Zellen und Zellbestandteilen, sowie deren räumliche Lokalisation innerhalb von Geweben. Das Prinzip der Färbung beruht darauf, dass ein Antikörper eine Affinität zu einem bestimmten Antigen besitzt und daran bindet. Die Lokalisation dieses Antigens wird dann durch die Markierung des Antikörpers sichtbar gemacht.

Erfolgt die Markierung des Antigens mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes (der sekundäre Antikörper ist dann Fluoreszenz-gekoppelt), wie etwa einem Fluorochrom, so wird dies als Immunfluoreszenz bezeichnet.

Durch die Mehrfach-Immunfluoreszenz kann eine Co-Lokalisation bestimmter Antigenstrukturen bestätigt oder ausgeschlossen werden.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit insgesamt 32 Muskelbiospien (Mi-2⁺ Patienten n=10, TIF-1γ⁺ Patienten n=9, MDA5⁺ Patienten n=10 und NDC n=3) durchgeführt. Zur Untersuchung verschiedener immunologischer Zellen und Strukturen wurden unterschiedliche histologische Färbungen in einer Färbekammer durchgeführt. Dazu wurden die zu färbenden Gewebeschnitte zunächst 20 min bei RT adaptiert und danach für 10 min in Aceton fixiert. Im Anschluss wurde die Schnitte für 30 min mit speziesangepasstem Normalserum (1:10 in PBS), abhängig von der Spezies, aus welcher der sekundäre Antikörper gewonnen wurde, blockiert. Dieser Schritt ist zur Verhinderung unspezifischer Bindungen notwendig. Es folgte die Inkubation der Schnitte mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C. Die Schnitte wurden gewaschen und anschließend für 2h bei RT mit dem sekundären Antikörper (Meerrettichperoxidase-gekoppelt) inkubiert. Danach erfolgte unter Lichtausschluss die Entwicklung durch die Enzym-Substrat-Reaktion mithilfe von 3,3' Diaminobenzidin (DAB). Die Reaktion wurde nach 10 min mit destilliertem Wasser gestoppt. Danach erfolgte die Gegenfärbung des Gewebes durch Behandlung mit Hämalaun für 5 s und anschließendes Spülen mit

lauwarmem Leitungswasser, wodurch sich die Zellkerne anfärben. Zuletzt wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (30 s in 70%, je 1 min in 80%, 96% und 100% Ethanol) und mittels Xylol geklärt. Eingedeckelt wurden die Schnitte mithilfe des ROTI-HISTOKIT 2.

3.2.2. Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden mit insgesamt 15 Muskelbiospien durchgeführt (Mi-2⁺ Patienten n=8, TIF-1 γ ⁺ Patienten n=4, MDA5⁺ Patienten n=3). Nach Adaptierung bei RT erfolgte die Fixierung der Muskelschnitte für 10 min in Aceton. Danach erfolgte für 30 min ein Blockieren der Schnitte mit speziesangepasstem Serum (1:10 in PBS), abhängig von der Spezies, aus welcher der sekundäre Antikörper gewonnen wurde. Im Anschluss wurden die primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachdem die Schnitte gewaschen worden waren, erfolgte die Inkubation mit den sekundären, entweder mit Alexa Fluorochrom 488 (grün leuchtend) oder Cy3 (rot leuchtend) markierten Antikörpern für 1h. Alle weiteren Schritte erfolgten unter Lichtausschluss.

Für die Doppelimmunfluoreszenz wurde das oben beschriebene Protokoll ein zweites Mal mit einem zweiten primären und sekundären Antikörper wiederholt. Zuletzt wurden die Muskelschnitte mithilfe des VECTASHIELD® Mounting Medium wässrig eingedeckelt, versiegelt und bei 4°C gelagert. Durch das im VECTASHIELD® Mounting Medium enthaltene DAPI wurden die Zellkerne blau gefärbt.

Fotografien der gefärbten Schnitte wurden mithilfe des Zeiss Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland) und der Axio Vision 4 Software (Zeiss, Göttingen, Deutschland) angefertigt und analysiert.

Die Lagerung der verwendeten Antikörper, sekundären Antikörper, Seren und anderer für die Färbung verwendeter Reagenzien erfolgte je nach Herstellerangabe, entweder bei 4°C oder -20°C.

3.3. Quantifizierung

3.3.1. Semiquantitativer Score

Ein semiquantitativer Score wurde von uns zur besseren Vergleichbarkeit der Patienten in Bezug auf PD-L1- und PD-L2- positiver Strukturen, definiert. Es wurden Muskelbiospien von insgesamt 29 DM Patienten untersucht (Mi-2⁺ Patienten n=10, TIF-

1 γ ⁺ Patienten n=9, MDA5⁺ Patienten n=10). Alle Fälle wurden von 0 (keine positiven Strukturen) bis 4 (bei PD-L1 fokal/diffus viele beziehungsweise bei PD-L2 diffus viel im Sarkoplasma und Sarkolemm) eingestuft (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9).

Tabelle 8: Semiquantitativer Score für PD-L1

| PD-L1- Expression | |
|-------------------|---|
| 0 | Keine positiven Strukturen |
| 1 | Singulär positive Strukturen |
| 2 | Fokal positive Strukturen |
| 3 | Mehrere fokal oder diffus positive Strukturen |
| 4 | Fokal oder diffus viele positive Strukturen |

Tabelle 9: Semiquantitativer Score für PD-L2

| PD-L2- Expression | |
|-------------------|--|
| 0 | Keine positiven Strukturen |
| 1 | Schwache sarkolemmale Färbung |
| 2 | Fokal kräftige sarkolemmale Färbung |
| 3 | Diffuse kräftige sarkolemmale Färbung |
| 4 | Diffuse sarkoplasmatische und sarkolemmale Färbung |

3.3.2. Zellzahl

Zur Quantifikation der PD1⁺ Zellen wurde pro Muskelbiopsie in 10 high power fields die Zellzahl ermittelt, wobei ein high power field (HPF) als eine Fläche von 0,16mm² für das von uns verwendete Mikroskop und die entsprechenden Okulare definiert ist. Es wurden Muskelbiospien von insgesamt 29 DM Patienten untersucht (Mi-2⁺ Patienten n=10, TIF-1 γ ⁺ Patienten n=9, MDA5⁺ Patienten n=10).

3.4. Molekularbiologische Methoden

Beim Anfertigen der Schnitte für die histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden pro Muskelbiopsie zweimal 20-30 Leerschnitte von 10µm Dicke abgeraspelt und in Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert.

3.4.1. DNA-Isolation

Um die Genexpression der Immuncheckpoint-assoziierten Moleküle zu untersuchen erfolgte die Isolierung der DNA aus dem Muskelgewebe von 32 Patienten (Mi-2⁺ Patienten n=12, TIF-1γ⁺ Patienten n=10, MDA5⁺ Patienten n=10). Mittels Zwei-Phasen Extraktion durch organische Lösungsmittel wurde diese Isolierung durchgeführt. Dabei kommt es zu einer Trennung in eine proteinhaltige, organische Phase und eine nukleinsäurehaltige, wässrige Phase.

Zur Isolation von DNA wurden 20-30 Leerschnitte à 10µm Dicke in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Vor Durchführung der DNA-Isolierung wurden die Proben für 10 min bei RT adaptiert.

Zunächst erfolgte der Zellaufschluss durch Zugabe von Proteinase K (Roche, Mannheim, Deutschland) 20%igem SDS und OLD-T-Puffer im Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 37°C bei 450rpm. Nach der Zugabe von RNase A wurden die Proben bei 37°C für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurden ¼ Volumenanteil Lösung C zugegeben, danach 1 Volumenanteil Chloroform. Dabei kommt es zu einer Zwei-Phasen-Bildung. Der wässrige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um eine DNA-Fällung auszulösen wurden 0,7 Volumenanteile Isopropanol zugegeben und das Gefäß langsam geschwenkt. Nach einer Zentrifugation (Multifuge SR3+, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei 13.000rpm für 20 min wurde das Isopropanol abgenommen und durch 500µl 70%iges Ethanol ersetzt. Das entstandene, gelartige DNA-Pellet wurde durch Schnipsen vom Gefäßrand gelöst. Nach nochmaligem 20-minütigen Zentrifugieren bei 13.000rpm wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und bei 37°C für 8 min getrocknet, bis das Pellet glasig wurde. Zuletzt wurde die DNA in 32µl TE für 1 h bei 37°C und 350rpm im Thermomixer gelöst. Die Proben wurden danach bei 4°C gelagert.

3.4.2. Gelelektrophorese

Das Prinzip der Elektrophorese beruht darauf, dass unterschiedlich geladene Teilchen in einem elektrischen Feld eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit besitzen. Dadurch entsteht eine Trennung von Ionen, die in Größe und Ladung differieren. Kleine, negativ geladenen Moleküle wandern schnell in Richtung Anode, positiv geladene Moleküle wandern in Richtung Kathode. In diesem Fall wurde die Methode der Gelelektrophorese angewendet, um eine etwaige Verunreinigung durch RNA festzustellen.

Dazu wurde die isolierte DNA in einem 0,9%-igen Agarosegel bei 100 Volt für 60 min aufgetrennt. Eine Visualisierung erfolgte auf dem Transluminator G:BOX Syngene Gerät.

3.4.3. Quantifizierung und Konzentrationsmessung der DNA

Die Quantifizierung und Messung der Konzentration der gewonnenen DNA erfolgte photometrisch mit dem Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Nach Herstellung einer Arbeitslösung mithilfe von Qubit® dsDNA BR Reagenz und Qubit® dsDNA BR Puffer wurden zunächst zwei Standardproben zur Kalibrierung des Qubit® 3.0 Fluorometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) erzeugt.

Danach wurden Proben aus je 1µl Patienten-DNA und 199µl der Arbeitslösung vorbereitet und diese dann mit dem Fluorometer getestet.

3.4.4. RNA-Isolation

Zur Analyse der Genexpression der Immuncheckpoint-assoziierten Moleküle, Zytokine und Chemokine erfolgte zunächst die RNA-Isolierung aus dem Muskelgewebe von 15 Patienten (Mi-2⁺ Patienten n=8, TIF-1 γ ⁺ Patienten n=7, MDA5⁺ Patienten n=7, Non-Disease Controls n=5). Zur Isolation der RNA wurden 20-30 Leerschnitte à 10µm Dicke in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Die RNA-Isolierung erfolgte nach der Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode. Dabei kommt es zur Bildung eines zwei Phasensystems mit einer organischen Phase, in der sich Proteine sammeln, und einer wässrigen Phase, in welcher sich die RNA löst.

Zunächst erfolgte die Homogenisierung des Muskelgewebes durch Zugabe von 800µl TriFast für 5 min bei RT. Durch das im Reagenz TriFast enthaltene Guanidinisothiocyanat werden Zellen lysiert und RNAsen inaktiviert, durch Phenol werden die DNA und Proteine gelöst. Durch Zugabe von 160µl Chloroform, 2-minütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation (12.000rpm für 10 min bei 4°C) kommt es zur Phasentrennung. Nach

Überführen des wässrigen Überstandes, in welchem sich die RNA befindet, wird die Präzipitation der RNA mithilfe von 0,5µl RNase-freiem Glykogen und 400µl Isopropanol eingeleitet. Danach erfolgte die Inkubation für 10 min bei RT. Durch Zentrifugation 12.000rpm für 10 min bei 4°C kommt es zur Bildung eines gelartigen RNA-Pellets. Dieses wurde vom Überstand getrennt, mit 800µl 75%iges Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand abgenommen und das Pellet für circa 20 min bei RT getrocknet. Im letzten Schritt wurde die RNA resuspendiert. Dazu wurde diese in 32µl Nuklease-freiem Wasser bei 55-60°C für 10 min inkubiert.

Die Konzentration und der Reinheitsgrad (A260/280-Quotienten von 1,6-2,1) der RNA wurde photometrisch mit dem TECAN® Infinite M200 Microplate Reader und der zugehörigen Software i-control (TECAN, Männedorf, Schweiz) gemessen.

3.4.5. cDNA-Synthese

Um die quantitative Real-Time PCR (qPCR) durchzuführen, muss zunächst die isolierte RNA mithilfe der Reversen Transkription in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Um die Kontamination durch DNA zu eliminieren, wurde ein DNase free Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) als Vorbehandlung verwendet. Ein DNase Verdauungsreagenz, bestehend aus DNase-Puffer und rDNase, wurde zu den Proben hinzugefügt und mit diesen für 30 min bei 37°C inkubiert. Um die DNase-Aktivität zu stoppen wurde dann ein DNase Inaktivierungsreagenz hinzugefügt und für 2 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (10.000rpm für 2 min bei RT) wurden die Proben ohne das ausgefällte Inaktivierungsreagenz in PCR-Reaktionsgefäße überführt.

Die Reverse Transkription der RNA erfolgte anschließend mithilfe des High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach Anleitung des Herstellers. Zur Umschreibung von einer Menge von 1µg RNA-Probe wurden zu 25µl der vorbehandelten RNA 25µl eines vorbereiteten Mastermixes, bestehend aus je 5µl 10xRT Puffer, 2µl 25xdNTP Mix, 5µl 10xRandom Primer, 2,5µl Reverse Transkriptase und 10,5µl Nuklease-freiem Wasser, gegeben. In Tabelle 10 werden die Reaktionsbedingungen für die cDNA-Synthese im PCR-Cycler dargestellt.

Tabelle 10: cDNA-Synthese unter folgenden Reaktionsbedingungen

| Temperatur | Zeit | Vorgang |
|------------|--------|--|
| 25°C | 10 min | Hybridisierung der Primer |
| 37°C | 2 h | Reverse Transkription |
| 85°C | 5 s | Inaktivierung der reversen Transkriptase |
| 4°C | | Bereithaltung zu Analyse |

3.4.6. Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Real-Time PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren bei gleichzeitiger Quantifikation der cDNA. Sie beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR. Durch Messungen des Fluoreszenz-Signals der Reporter-Sonde während der exponentiellen Amplifikationsphase jedes PCR-Zyklus erfolgt die Quantifikation der cDNA.

Durchgeführt wurde die qPCR mit einem Endvolumen von 20µl mit 20ng cDNA unter Zugabe des TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, eines TaqMan® Gene Expression Assays, sowie RNase freiem Wasser in einem 7900HT Fast Real-Time PCR System. Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt: siehe Tabelle 11.

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen der qPCR

| Temperatur | Zeit | Anzahl Zyklen | Vorgang |
|------------|------|---------------|-------------------------------------|
| 95°C | 20 s | | Initiale Denaturierung |
| 95°C | 1 s | 45 | Denaturierung |
| 60°C | 20 s | 45 | Primerhybridisierung und Elongation |

Es erfolgte eine Dreifachbestimmung aller eingesetzten TaqMan® Sonden mit jeder DNA-Probe. Zur Berechnung des Expressionslevels der Zielantigene wurde eine relative Quantifizierung mithilfe der komparativen $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewandt. Der C_T -Wert (Schwellenwert-Zyklus, englisch: cycle of threshold) gibt an, ab welcher Zyklusanzahl das Fluoreszenzsignal erstmals die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. In den ersten Zyklen zeigt sich noch kein messbarer Anstieg des Fluoreszenzsignales, doch ab einer gewissen Zyklusanzahl nimmt die Fluoreszenz exponentiell zu. Bei einer 100%-ig effizienten PCR würde sich bei jedem Zyklus die Menge der DNA und somit auch das Fluoreszenzsignal verdoppeln. Je höher also die Menge der DNA zu Beginn der Reaktion ist, desto geringer

die Anzahl der Zyklen, die notwendig sind, um den Schwellenwert-Zyklus zu erreichen, das heißt desto niedriger ist der C_T -Wert. Die C_T -Werte der Zielantigene wurde in Bezug zu den C_T -Werten einer endogenen Kontrolle, eines sogenannten „Housekeeping-Gens“, das ubiquitär und zu jeder Zeit gleichmäßig exprimiert wird, gesetzt (ΔC_T). Dadurch wird eine Normalisierung erzielt. Der ΔC_T -Wert von gesunden Kontrollen wurde dann vom ΔC_T -Wert von Patienten mit DM subtrahiert um den $\Delta\Delta C_T$ -Wert zu erhalten. Die arithmetische Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ gibt schließlich den relativen Expressionsunterschied eines Genes zwischen einem Patienten mit DM und einem gesunden Kontrollpatienten, nach Normalisierung zum Referenzgen und in Bezug auf eine Standardprobe an. Als Housekeeping- Gen wurde bei diesen Versuchen *PGK1* verwendet. Die Evaluierung der Ergebnisse erfolgte mithilfe der SDS 2.4 Software sowie dem Relative Quantification (RQ) Manager (beide von Applied Biosystems, Foster City, USA).

3.4.7. Whole Exome Sequenzierung (WES)

Die Whole Exome Sequenzierung wurde an ausgewählten Muskelbiopsien aus jeder Antikörpergruppe durchgeführt. Auswahlkriterien beinhalteten die Qualität der Muskelbiopsie, Vorhandensein von typischen Muskelveränderungen je nach Antikörperzugehörigkeit, wie zum Beispiel DM typische Entzündungsinfiltrate und perifaszikuläre Atrophie bei Mi-2⁺ Patienten. Insgesamt wurden 12 Patientenproben untersucht: Mi-2⁺ Patienten n=5, TIF-1 γ ⁺ Patienten n=4 und MDA5⁺ Patienten n=3. Zur Sequenzierung eingesandt wurden Proben mit einer Menge von 1 μ g DNA und einer Konzentration 50ng/ μ l.

Um ein Target Enrichment zu erzielen wurden die Exomsequenzen durch das SureSelect V5 Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) angereichert. Danach erfolgte die Sequenzierung mithilfe der HiSeq4000 Machine (Illumina, San Diego, CA) als 101 bp paired-end Fragmente, die mit der humanen Gensequenz GRCh37.p11 (hg19/Ensembl 72) abgestimmt wurden. Untersucht wurden die Sequenzen auf Abweichungen in allen codierenden Exons sowie den angrenzenden Regionen im Bereich von ± 20 bp. Jede dieser Varianten wurde mithilfe der MutationTaster2 Software [<http://www.mutationtaster.org/>] (114) untersucht, um potenziell-pathogene Varianten zu identifizieren. Varianten wurden ausgeschlossen, wenn diese in der ExAc Datenbank bei >20 Fällen [<http://exac.broadinstitute.org>, aufgerufen im April 2020], beziehungsweise im 1000 Genomes Project bei >20 Fällen Project [<http://exac.broadinstitute.org>, aufgerufen im April 2020] auftraten. Ein weiterer Ausschussgrund war eine Kopienanzahl

von <50. Im Anschluss wurden alle potenziell-pathogene Varianten der Patienten miteinander verglichen.

Die Analyse der WES wurde mit dem Mutation Distiller [<https://www.mutationdistiller.org/>] (115) durchgeführt. Um die Analyse so wenig wie möglich einzuschränken wählten wir folgende Kriterien:

Anzahl der angezeigten Gene: 10.000, Vererbungsart: / und Variantenselektion: ClinVar/nonsense sowie non-synonymous disease mutations.

Zur Untersuchung unserer Fragestellung wurde für die Analyse parallel eine Liste von interessanten Kandidatengenen des PD1 Signalweges und Genen der Interferon-Signatur erstellt. Diese wurden unter anderem aus Veröffentlichungen von Greenberg et al. (31, 49, 51) und Salmaninejad *et al.* (66) zusammengestellt; hierauf basierend wurde dann eine Analyse mithilfe der STRING Webseite [<https://string-db.org/>] durchgeführt um weitere Proteine, die mit Proteinen der Kandidatengenen interagieren könnten, herauszufinden. Für eine Auflistung der Kandidatengene siehe Tabelle 12 und Tabelle 13.

Tabelle 12: Auflistung der Kandidatengene des PD1-Signalweges

| Kandidatengene des PD1-Signalweges | | |
|------------------------------------|----------|----------|
| AKT2 | HLA-DRA | PIK3CD |
| AKT3 | HLA-DRB1 | PIK3CG |
| B3GAT1 | HRAS | PIK3R1 |
| BTLA | ICOS | PIK3R2 |
| CD244 | IL2RA | PIK3R3 |
| CD27 | IL4 | PIK3R4 |
| CD274 | ITPR1 | PIK3R5 |
| CD28 | ITPR2 | PIK3R6 |
| CD3D | ITPR3 | PLEKHA8 |
| CD3E | KLRG1 | PTPN6 |
| CD3G | KRAS | RASA1 |
| CD4 | LAG3 | RRAS |
| CD40LG | LCK | RRAS2 |
| CD68 | MAP2K2 | TBX21 |
| CD8A | MAPK3 | TIGIT |
| CLEC4C | MRC1 | TNF |
| CTLA4 | NRAS | TNFRSF18 |
| ENTPD1 | PDCD1 | TNFRSF4 |
| EOMES | PDCD1LG2 | TNFRSF9 |
| FOXP3 | PIK3C2A | VEGFB |
| HAVCR2 | PIK3C2B | VEGFC |
| HLA-DQA1 | PIK3C2G | VEGFD |
| HLA-DQB1 | PIK3C3 | VSIR |
| HLA-DQB2 | PIK3CB | ZAP70 |

Tabelle 13: Auflistung der Kandidatengene der Interferon-Signatur

| Kandidatengene der Interferon-Signatur | | | | |
|--|----------------|---------------------|-----------------|----------------|
| <i>ADAR</i> | <i>IFIT2</i> | <i>IFRD1</i> | <i>MNDA</i> | <i>STK11</i> |
| <i>AKT1</i> | <i>IFIT3</i> | <i>IFRD2</i> | <i>MOV10</i> | <i>SUN2</i> |
| <i>ANKRD2</i> | <i>IFIT5</i> | <i>IKBKB</i> | <i>MPL</i> | <i>SYNDIG1</i> |
| <i>APOBEC3B</i> | <i>IFITM1</i> | <i>IL10</i> | <i>MS4A4A</i> | <i>SNDIG1L</i> |
| <i>ASNS</i> | <i>IFITM10</i> | <i>IL10RA</i> | <i>MTOR</i> | <i>SYTL1</i> |
| <i>BAG3</i> | <i>IFITM2</i> | <i>IL10RB</i> | <i>MX1</i> | <i>TAP1</i> |
| <i>BST2</i> | <i>IFITM3</i> | <i>IL11RA</i> | <i>MX2</i> | <i>TICAM1</i> |
| <i>CASP1</i> | <i>IFITM4P</i> | <i>IL12B</i> | <i>MYD88</i> | <i>TIMP1</i> |
| <i>CAV1</i> | <i>IFITM5</i> | <i>IL13RA1</i> | <i>NAMPT</i> | <i>TIRAP</i> |
| <i>CCL2</i> | <i>IFITM8P</i> | <i>IL15</i> | <i>NFATC1</i> | <i>TLR1</i> |
| <i>CCL5</i> | <i>IFITM9P</i> | <i>IL20RA</i> | <i>NFKB1</i> | <i>TLR10</i> |
| <i>CD70</i> | <i>IFNA1</i> | <i>IL20RB</i> | <i>NFKBIA</i> | <i>TLR2</i> |
| <i>CD74</i> | <i>IFNA10</i> | <i>IL21R</i> | <i>NMI</i> | <i>TLR3</i> |
| <i>CD80</i> | <i>IFNA11P</i> | <i>IL22RA2</i> | <i>NOS2</i> | <i>TLR4</i> |
| <i>CD86</i> | <i>IFNA12P</i> | <i>IL2RB</i> | <i>NT5C3A</i> | <i>TLR5</i> |
| <i>CDKN1B</i> | <i>IFNA13</i> | <i>IL2RG</i> | <i>OAS1</i> | <i>TLR6</i> |
| <i>CGAS</i> | <i>IFNA14</i> | <i>IL31RA</i> | <i>OAS2</i> | <i>TLR7</i> |
| <i>CHUK</i> | <i>IFNA16</i> | <i>IL3RA</i> | <i>OAS3</i> | <i>TLR8</i> |
| <i>CIITA</i> | <i>IFNA17</i> | <i>IL4R</i> | <i>OASL</i> | <i>TLR9</i> |
| <i>CNTFR</i> | <i>IFNA2</i> | <i>IL5RA</i> | <i>P2RY6</i> | <i>TMEM233</i> |
| <i>CRLF2</i> | <i>IFNA20P</i> | <i>IL6</i> | <i>PIK3CA</i> | <i>TMEM91</i> |
| <i>CRP</i> | <i>IFNA21</i> | <i>IL6R</i> | <i>PIP</i> | <i>TNFSF10</i> |
| <i>CSF2RA</i> | <i>IFNA22P</i> | <i>IL7R</i> | <i>PLSCR1</i> | <i>TRAF3</i> |
| <i>CSF3R</i> | <i>IFNA4</i> | <i>IL9R</i> | <i>PMIS2</i> | <i>TRAF6</i> |
| <i>CXCL10</i> | <i>IFNA5</i> | <i>IRF1</i> | <i>PML</i> | <i>TRAM1</i> |
| <i>DDIT4</i> | <i>IFNA6</i> | <i>IRF2</i> | <i>PRKCZ</i> | <i>TRARG1</i> |
| <i>DDC58</i> | <i>IFNA7</i> | <i>IRF2BP1</i> | <i>PRRT1</i> | <i>TREX1</i> |
| <i>DDX60</i> | <i>IFNA8</i> | <i>IRF3</i> | <i>PRRT1B</i> | <i>TRIB3</i> |
| <i>DHCR24</i> | <i>IFNAR1</i> | <i>IRF4</i> | <i>PRRT2</i> | <i>TRIM25</i> |
| <i>EBI3</i> | <i>IFNAR2</i> | <i>IRF5</i> | <i>PSME1</i> | <i>TRIM5</i> |
| <i>EIF2AK2</i> | <i>IFNB1</i> | <i>IRF6</i> | <i>PSME2</i> | <i>TTN</i> |
| <i>EIF4B</i> | <i>IFNE</i> | <i>IRF7</i> | <i>PTEN</i> | <i>TYK2</i> |
| <i>F3</i> | <i>IFNG</i> | <i>IRF8</i> | <i>PTPN11</i> | <i>USP18</i> |
| <i>GBP1</i> | <i>IFNGR1</i> | <i>IRF9</i> | <i>PYHIN1</i> | <i>VEGFA</i> |
| <i>GBP2</i> | <i>IFNGR2</i> | <i>IRGM</i> | <i>RAF1</i> | <i>XAF1</i> |
| <i>HLA-A</i> | <i>IFNK</i> | <i>ISG15</i> | <i>RPS6KB1</i> | <i>ZC3HAV1</i> |
| <i>HLA-B</i> | <i>IFNL1</i> | <i>ISG20</i> | <i>RSAD2</i> | |
| <i>HLA-E</i> | <i>IFNL2</i> | <i>JADE2</i> | <i>RTP4</i> | |
| <i>HLA-G</i> | <i>IFNL3</i> | <i>JAK1</i> | <i>SH2D1A</i> | |
| <i>HPSE</i> | <i>IFNLR1</i> | <i>JAK2</i> | <i>SHB</i> | |
| <i>IFI16</i> | <i>IFNMP1</i> | <i>LEPR</i> | <i>SLC15A3</i> | |
| <i>IFI27</i> | <i>IFNW1</i> | <i>LOC110599582</i> | <i>SLC25A28</i> | |
| <i>IFI30</i> | <i>IFNWP15</i> | <i>MAL</i> | <i>SOCS1</i> | |
| <i>IFI35</i> | <i>IFNWP18</i> | <i>MAP2K1</i> | <i>SP110</i> | |
| <i>IFI44</i> | <i>IFNWP19</i> | <i>MAP3K14</i> | <i>SSBP3</i> | |
| <i>IFI44L</i> | <i>IFNWP2</i> | <i>MAPK1</i> | <i>STAT1</i> | |
| <i>IFI6</i> | <i>IFNWP4</i> | <i>MAPK14</i> | <i>STAT2</i> | |
| <i>IFIH1</i> | <i>IFNWP5</i> | <i>MAPK8</i> | <i>STAT3</i> | |
| <i>IFIHT1</i> | <i>IFNWP9</i> | <i>MET</i> | <i>STING1</i> | |

Nach der Untersuchung der WES Daten mit diesen Faktoren wurden die erhaltenen Genlisten in einer ersten Analyse auf mehrfach vorkommende Gene überprüft, also Gene, die bei allen 12 Patienten vorkamen, beziehungsweise Gene, die nur in einer AK Subgruppe vorkamen oder in zwei AK Gruppen und in einer nicht. Wir erhielten so Gene, die wir als „DM spezifisch“ und als „AK spezifisch“ titulierten.

In einer zweiten Suche wurden alle durch Untersuchung der WES Daten mit oben genannten Faktoren erhaltenen Gene mit unserer Kandidatengenliste abgeglichen.

Danach wurde überprüft, ob die entdeckten Mutationen in ihren Varianten bei allen Patienten übereinstimmten.

Zuletzt erfolgte eine intensive Literatursuche über die erhaltenen Genen über Pubmed [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>], HUGO Gene Nomenclature Comitee [<https://www.genenames.org/>] und GeneCards [<https://www.genecards.org/>] (116). Über eine Analyse mit der Webseite STRING [<https://string-db.org/>] wurden Protein-Protein Interaktionen evaluiert und inwieweit eine Interaktion zwischen den Proteinen der gefundenen Gene und bereits bekannten relevanten Proteinen der DM Pathogenese bestehen könnte.

In Abbildung 1 wird das Vorgehen zur Auswertung der WES Daten dargestellt.

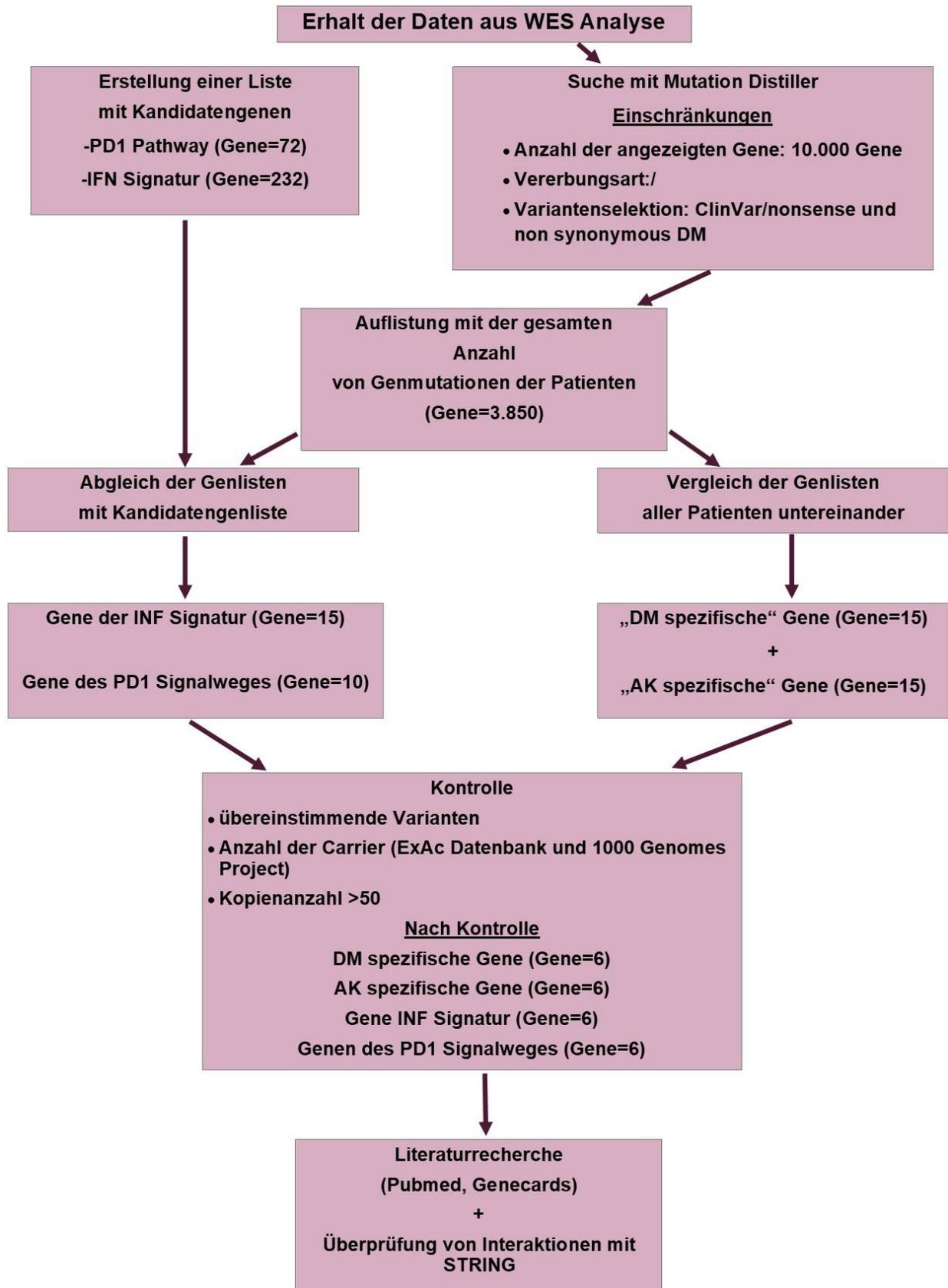


Abbildung 1: Flowchart zur Auswertung der WES Daten

3.5. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung für die qPCR Ergebnisse und die Auswertung der semiquantitativen Scores erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.0.2 (Graphpad Software Inc., San Diego, USA). Zur Analyse der RQ-Werte wurde der parameterfreie H-test nach Kruskal-Wallis mit anschließender Dunn Korrektur genutzt. Die Graphiken zeigen den Mittelwert \pm SEM. Der p-Wert wurde auf $p \leq 0,05$ als signifikant festgelegt (* $\triangleq p < 0.05$, ** $\triangleq p < 0.01$, *** $\triangleq p < 0.001$).

4. Ergebnisse

4.1. Epidemiologische und klinische Charakteristika der Patienten

In der vorliegenden Studie wurden Skelettmuskelbiopsien (n=37) von Patienten mit diagnostizierter Dermatomyositis (DM) untersucht, sowie von sieben gesunden Kontrollpatienten.

Von den DM Patienten waren 25 weiblich (69%) und 11 männlich (31%), das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme betrug 55 ± 16 Jahre. Anhand des nachgewiesenen MSA wurden die Muskelbiopsien in drei Gruppen unterteilt: Mi-2⁺ Patienten: n=14, TIF-1 γ ⁺ Patienten n=13 und MDA5⁺ Patienten n=10. Als Normalkontrollen wurden Muskelbiopsien von neurologisch gesunden Patienten herangezogen, die wegen unspezifischer Beschwerden der Patienten entnommen worden waren, um eine Myopathie auszuschließen (siehe oben). Dabei wurde darauf geachtet, dass Alter und Geschlecht auf die Patientenkohorte abgestimmt waren.

Im Zusammenhang mit der Entnahme der Muskelbiopsien wurden während desselben Aufenthaltes die Standardlaborparameter inklusive Kreatinkinase (CK)-Werte ermittelt, sowie die klinischen Symptome umfangreich dokumentiert. CK Werte waren bei 24 Patienten erhöht, von sieben Patienten konnte im Nachhinein kein CK-Wert ermittelt werden; insgesamt fünf Patienten wiesen bei Biopsieentnahme keinen erhöhten CK-Wert auf. Bei 27 Patienten war eine Muskelschwäche feststellbar. Muskelschmerzen konnten bei 16 Patienten festgestellt werden. Hautexantheme in der Form von typischen DM Hautmanifestationen (wie etwa Gottron Papel oder heliotropes Erythem) zeigten sich bei 34 Patienten. Atypische DM Hautmanifestationen wie Ulzerationen oder Kalzifikationen lagen bei 10 Patienten vor, davon waren neun MDA5⁺ Patienten. Bei 13 Patienten lag zum Diagnosezeitpunkt/anamnestisch eine Neoplasie vor, neun davon waren TIF-1 γ ⁺ Patienten.

Von den 36 Patienten hatten acht Patienten eine akute oder subakute ILD, sieben davon waren MDA5⁺ Patienten. Die therapeutischen Strategien beinhalteten Glukokortikoide, Azathioprin, Methotrexat, intravenöse Immunglobuline, aber auch Ciclosporin und Cyclophosphamid. Die medikamentöse Therapie war dabei individuell auf die jeweiligen Bedürfnisse des Patienten abgestimmt worden.

Die Zusammenfassung der klinischen Daten findet sich in Tabelle 14. Für eine ausführliche Tabelle, welche die klinischen Daten der Patienten zusammenfasst siehe Tabelle 15, Tabelle 16, Tabelle 17 und Tabelle 18.

Tabelle 14: Zusammenfassung der klinischen Patientencharakteristika

| | | Mi-2 ⁺ (n=14) | TIF-1γ ⁺ (n=13) | MDA5 ⁺ (n=9) | NDC (n=7) |
|------------------------------------|-----------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------|
| Alter in Jahren (mean ± SD) | | 58±15 | 63±14 | 41±14 | 47±4 |
| Geschlecht | weiblich | 57% (8) | 77% (10) | 78% (7) | 43% (3) |
| | männlich | 43% (6) | 237% (3) | 22% (2) | 57% (4) |
| Lokalisation d. Biopsie | M. deltoideus | 14 | 8 | 9 | 3 |
| | andere | | 2 | | 2 |
| | unbekannt | | 3 | | 2 |
| CK-Werte | normal | / | 1 | 4 | 7 |
| | erhöht | 1 | 3 | 2 | |
| | >5fach erhöht | 4 | 2 | 1 | |
| | >10fach erhöht | 7 | 3 | 1 | |
| | unbekannt | 2 | 4 | 1 | |
| Muskelsymptome | Muskelschwäche | 6 | 9 | | 1 |
| | Muskelschmerzen | 3 | 6 | | 5 |
| | unbekannt | | 1 | | |
| Typische DM Hautläsionen | positiv | 13 | 11 | 9 | |
| | unbekannt | 1 | 2 | / | |
| Atypische DM Hautläsionen | vorhanden | / | 1 | 9 | |
| | nicht vorhanden | 14 | 12 | / | |
| ILD, % | bekannt | 1 | / | 7 | / |
| | ohne ILD | 12 | 12 | 2 | 7 |
| | unbekannt | 1 | 1 | / | / |
| Neoplasie | vorhanden | 4 | 9 | / | / |
| | nicht vorhanden | 10 | 4 | 9 | 7 |
| Therapie | Glukokortikoide | 11 | 9 | 9 | |
| | Azathioprin | 1 | 2 | 4 | |
| | MTX | 4 | 7 | 3 | |
| | IvIG | 4 | 5 | 1 | |
| | unbekannt | 3 | 2 | / | |
| | keine | / | / | / | 7 |

Tabelle 15: Epidemiologische und klinische Charakteristika der Mi-2⁺ Patienten

Legende: Pat. = Patienten, m = männlich, w = weiblich, § = unbekannt, OE = obere Extremität, UE = untere Extremität, UA = Unterarm, OA = Oberarm, OSCH = Oberschenkel, USCH = Unterschenkel, CT = Glukokortikoide, MTX = Methotrexat, IVIG = intravenöse Immunglobuline, AZA = Azathioprin, MMF = Mykophenolat-Mofetil, EDX=

| Mi-2 n=14 | Lok. Biopsie | Alter [a] bei Biopsie | CK-Werte bei Biopsie [U/L] | Muskelsymptome Schwäche=1, Schmerzen=2 | Dysphagie, 1=ja | Exanthem | ILD, 1=ja, 0=nein | Neoplasie | Therapie | |
|--------------|-----------------|--------------------------|-------------------------------|---|---|----------|--|-----------|--|--------------------------|
| Pat. 1 | w | Delt | 86 | § | 2, proximale Schmerzen der Extremitäten | § | livide Verfärbung Gesicht, OA, Dekolleté | 0 | § | § |
| Pat. 2 | m | Delt | 58 | 3780 U/L | 1, proximal betonte Paresen der Extremitäten, Schultergürtel, Atrophien | § | squamatöses Erythem an Armen und Dekolleté | 0 | § | § |
| Pat. 3 | w | Delt | 72 | 912 U/L | 1, Nacken, OA und OSCH | 1 | Hautrötung im Gesicht | 0 | § | CT |
| Pat. 4 | m | Delt | 54 | 2394 U/L | 1, Extremitäten; 2 aufstehen aus dem Liegen und Sitzen schwer; Elevation d. Arme über Schultern nicht möglich | § | weißliche Plaques an linker Patella | 0 | § | CT |
| Pat. 5 | w | Delt | 38 | § | 1 in Armen zunächst nur bei Belastung im Verlauf in Ruhe; 2, Parese der Arme | § | Hinweis auf Erythema nodosum | 0 | § | § |
| Pat. 6 | m | Delt | 57 | 780 U/L | 1, Oberschenkel, Schultergürtel, beidseits bei Treppenlaufen, und Elevation der Arme über Kopf | § | typische DM Hautmanifestationen | 0 | § | CT |
| Pat. 7 | w | Delt | 60 | 500 U/L (10/16), im Verlauf 319 U/L (10/17) | 1, proximale Muskelschwäche, kann aus Hocke nicht aufstehen | § | § | 0 | Endometrium Ca + intraduktal papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) | CT; CT + Cyclophosphamid |
| Pat. 8 | w | Delt | 84 | 2247 U/L | 2 | 1 | isoliertes V-Neck Zeichen | 0 | 1 | CT +AZA + IVIG |
| Pat. 9 | w | Delt | 67 | 6400 U/L | 1, 2 | 1 | typische DM Hautmanifestationen | 1 | GIST (Magen) - August 2013 | CT + MTX - IVIG |
| Pat. 10 | w | Delt | 47 | 4549 U/L | 1, 2 | 0 | typische DM Hautmanifestationen | 0 | 0 | CT + MTX - IVIG |
| Pat. 11 | w | Delt | 52 | 1039 U/L | 2 | 0 | typische DM Hautmanifestationen | 0 | 0 | CT +MTX |
| Pat. 12 | m | Delt | 46 | 1325 U/L | 1, 2 | 1 | typische DM Hautmanifestationen | 0 | 0 | CT+MTX |
| Pat. 13 | m | Delt | 57 | 10800 U/L | 2 | 0 | isoliert periungeales Erythema | 0 | 1 | CT + IVIG |
| Pat. 14 | m | Delt | 31 | 9000 U/L | 1, 2 | 0 | typische DM Hautmanifestationen | § | 0 | CT |

48 **Tabelle 16: Epidemiologische und klinische Charakteristika der TIF1- γ^+ Patienten**

Legende: Pat. = Patienten, m = männlich, w = weiblich, § = unbekannt, OE = obere Extremität, UE = untere Extremität, UA = Unterarm, OA = Oberarm, OSCH = Oberschenkel, USCH = Unterschenkel, CT = Glukokortikoide, MTX = Methotrexat, IVIG = intravenöse Immunglobuline, AZA = Azathioprin, MMF = Mykophenolat-Mofetil, EDX=

| TIF1- γ n=13 | Lok. Biopsie | Alter [a] bei Biopsie | CK-Werte bei Biopsie [U/L] | Muskelsymptome Schwäche=1, Schmerzen=2 | Dysphagie, 1=ja | Exanthem | ILD, 1=ja, 0=nein | Neoplasie | Therapie | |
|------------------------|-----------------|--------------------------|-------------------------------|---|---|------------|---|-----------|---|---|
| Pat. 15 | m | Delt | 69 | 1620 U/L | 2, distale Armmuskulatur, Oberarm-muskulatur, Schultermuskulatur und OSCH | § | § | 0 | 0 | CT, dann MTX |
| Pat. 16 | w | Delt | 64 | unter Therapie 150 U/L 08/13 | 1 und 2 in Schultergürtel, Beckengürtel; UA- und USCH- Atrophie; Schmerzen in Händen und Fingerkuppen-bereich | 1, morgens | Hauterythem im Bereich des Gesichts/ Dekolleté/ Extremitäten und Gottron-Zeichen; Rötungen an Knöchel, Streckseiten der Gelenke | 0 | § | CT seit 04/13 / Quensyl kein Effekt/ Z. n. MTX/ dann Ciclosporin |
| Pat. 17 | w | Delt | 72 | § | 1, progrediente proximal betonte Tetraparese, Bulbärsyndrom; Dysarthrie; respirat Insuffizienz | 1 | periorbitale livide Hautveränderungen | 0 | Mamma-Ca | CT, Plasmapherese; IVIG, Cyclophosphamid |
| Pat. 18 | w | Pec | 81 | 600 U/L | 1, leichtgradige Tetraparese, proximale Schwäche der UE, Dysarthrie | 1 | livide Hauteffloreszenz; Ulzera | 0 | Ovarial-CA mit malignem Pleuraerguss | AZA + CT + IVIG |
| Pat. 19 | w | § | 60 | CK initial 2400 U/L, im Verlauf 298 U/L | 1, vor 6 Monaten Belastungsdyspnoe, vor 8 Wochen proximale Paraparese, vor 4 Wochen proximale Armparesen, proximal betonte Tetraparese insbesondere der Hüftbeugung und Oberarm-Elevation und Kopfhebung | § | Erytheme, Ödem gesamten Haut+ Gesicht | 0 | Unbek. Gyn Tumor (Adnexe), endo- metroides Adeno- Ca | CT |
| Pat. 20 | w | Delt | 83 | 420U/L | 1, seit 6-8 Wochen progrediente schmerzlose Tetraparese, proximale Betonung | § | § | 0 | Colon-CA 08/16 | § |
| Pat. 21 | w | Delt | 54 | 01/17 81 U/l | 1 und 2 (3/5) Arme und Beine | § | Exanthem Gesicht, Hals, Dekolleté, Nacken, Arme und Hände, schuppig, verhärtet, gerötet; periunguales Erythem; Alopezie | 0 | Zervix-CA 2001/2007 | 1. CT -> 2. IVIG; CT +MTX |
| Pat. 22 | w | § | 43 | CK initial 2000 U/l, in domo 1300 U/L (07/17) | 1 OSCH und OA, 2, Oberarme, Schultern, Nacken, Oberschenkel | § | periorbitales Ödem | 0 | Mamma-Ca 2007, Ovariale RF unklarer Genese | MTX 1x/wöchentlich |

| TIF1-γ n=13 | Lok. Biopsie | Alter [a] bei Biopsie | CK-Werte bei Biopsie [U/L] | Muskelsymptome Schwäche=1, Schmerzen=2 | Dysphagie, 1=ja | Exanthem | ILD, 1=ja, 0=nein | Neoplasie | Therapie | |
|----------------|-----------------|--------------------------|-------------------------------|--|---|----------|---|-----------|---------------------------------------|--|
| Pat. 23 | w | § | 47 | initial CK erhöht; unter Therapie 88 U/L 08/17; ED 15 | 1, 2, Arme generalisiert, Beine proximal betont | 1 | Neurodermitis; generalisierter Hautbefund mit Streckseiten- betonten Erythemen an allen Extremitäten erythematös-livide, stark infiltrierende Plaques mit Schuppung | 0 | § | MTX/AZA/IVIG; Basistherapeutiku m Resochin/ Tofacitinib |
| Pat. 24 | m | Gastrocn emius | 58 | 466 U/L | 1 Schultergürtel und Beinen; 2 Hände bds; Schultergürtel; Aufstehen von Stuhl nur schwer möglich | § | livides Exanthem Hals, Gesicht und OA | 0 | Nasopharynx- PECA, metastasiert | CT |
| Pat. 25 | w | Delt | 76 | 244 U/L | 1, Dysarthrie; proximale Paraparese der Arme, 2, nicht näher definierte Myalgien | 1 | Lilac edema, Ödeme der OE | 0 | Ovarial-Ca | 1.CT iv/oral 2. Steigerung: + MTX 1x/w |
| Pat. 26 | w | Delt | 38 | § | 1 | § | typische DM Hautmanifestationen | § | § | § |
| Pat. 27 | m | Delt | 69 | 1100 U/L | 1 | 1 | typische DM Hautmanifestationen | 0 | Urothel-Ca- Okt 2008 - | CT + MTX - IVIG |

Tabelle 17: Epidemiologische und klinische Charakteristika der MDA5⁺ Patienten

Legende: Pat. = Patienten, m = männlich, w = weiblich, § = unbekannt, OE = obere Extremität, UE = untere Extremität, UA = Unterarm, OA = Oberarm, OSCH = Oberschenkel, USCH = Unterschenkel, CT = Glukokortikoide, MTX = Methotrexat, IVIG = intravenöse Immunglobuline, AZA = Azathioprin, MMF = Mykophenolat-Mofetil, EDX=

| MDA5 n=10 | | Lok. Biopsie | Alter (a) bei Biopsie | CK-Werte zum Zeitpunkt der Biopsie in U/L | Muskelsymptome ; Schwäche=1, Schmerzen=2 | Dysphagie, 1=ja | Typische DM Hautmanifestation (Gottron Papeln, Erytheme) | Atypische DM Hautmanifestation (Ulcerata, Kalzifikationen) | ILD, 1=ja, 0= nein | Neoplasie | Therapie |
|--------------|---|-----------------|--------------------------|---|--|--------------------|---|---|-----------------------|-----------|----------------------------------|
| Pat. 28 | m | Delt | 28 | 1167 U/L | 1, 2 | 0 | vorhanden | vorhanden | 0 | 0 | CT + MMF + Ciclosporin |
| Pat. 29 | w | Delt | 38 | 358 U/L | 0 | 0 | vorhanden | vorhanden | 1 | 0 | CT + Ciclosporin + IVIG + EDX |
| Pat. 30 | w | Delt | 59 | 5000 U/L | 1, 2 | 0 | vorhanden | vorhanden | 1 | 0 | CT + EDX |
| Pat. 31 | w | Delt | 73 | 42 U/L | 0 | 0 | vorhanden | 0 | 1 | 0 | CT + AZA |
| Pat. 32 | w | Delt | 45 | 47 U/L | 0 | 0 | vorhanden | vorhanden | 1 | 0 | CT + AZA + EDX |
| Pat. 33 | w | Delt | 30 | 350 U/L | vorhanden | 1 | vorhanden | vorhanden | 0 | 0 | CT + MTX |
| Pat. 34 | m | Delt | 31 | § | 1 | 0 | vorhanden | vorhanden | 1 | 0 | CT + MTX |
| Pat. 35 | w | Delt | 32 | 97 U/L | 0 | 0 | vorhanden | vorhanden | 1 | 0 | CT + AZA |
| Pat. 36 | w | Delt | 38 | 50 U/L | 0 | 0 | vorhanden | vorhanden | 1 | 0 | CT + EDX + AZA |
| Pat. 37 | m | Delt | 34 | 2592 U/L | 1 | 0 | vorhanden | vorhanden | 1 | 0 | CT + MTX |

Tabelle 18: Epidemiologische und klinische Charakteristika der gesunden Kontrollprobanden (NDC)

Legende: Pat. = Patienten, m = männlich, w = weiblich, § = unbekannt, OE = obere Extremität, UE = untere Extremität, UA = Unterarm, OA = Oberarm, OSCH = Oberschenkel, USCH = Unterschenkel, CT = Glukokortikoide, MTX = Methotrexat, IVIG = intravenöse Immunglobuline, AZA = Azathioprin, MMF = Mykophenolat-Mofetil, EDX =

| NDC n=7 | | Lok. Biopsie | Alter (a) bei Biopsie | CK-Werte zum Zeitpunkt der Biopsie in U/L | Muskelsymptome; Schwäche=1, Schmerzen=2 | Dysphagie, 1=ja | Exanthem | ILD, 1=ja, 0=nein | Neoplasie | Therapie |
|------------|---|-----------------|--------------------------|---|---|--------------------|---|----------------------|-----------|----------|
| NDC 1 | m | Quad | 52 | 58,2 U/L | 2 OSCH und Waden bds | § | § | | § | § |
| NDC 2 | w | Delt | 49 | 56 U/L | 1, Parese rechte Hand | § | § | | § | § |
| NDC 3 | w | § | 40 | 60U/L | 2 nach Anstrengung, schnelle Muskelermüdung | § | Erythem und Pruritus auf OA | | § | § |
| NDC 4 | m | Delt | 47 | 42 U/L | Arthralgien und 2 in wechselnden Lokalisationen seit 6 Monaten | § | § | | § | § |
| NDC 5 | w | § | 51 | 61 U/L | 1, belastungsabhängige Myalgie USCH/Waden, Schmerzen Hände und Füße | § | 0 | | § | § |
| NDC 6 | m | rect fem | 43 | 80 U/L | 2, OSCH und Schultern | § | Sonnenbrandartiges Gefühl, Schwellungsgefühl der Hände, Füße | | § | § |
| NDC 7 | m | Delt | 47 | 115 U/L | 1, 2 im gesamten Körper | § | § | | § | § |

4.2. Morphologische Untersuchungen

4.2.1. Histologie gesunder Kontrollpatienten

Zum Vergleich mit den untersuchten Muskelschnitten von erkrankten Patienten werden in Abbildung 2 die gesunden, normalen Gewebs- und Zelleigenschaften in verschiedenen Färbungen gezeigt.

Die Biopsie eines gesunden Muskels zeigt mehrkernige, polygonale Muskelzellen ohne Kalibervarianz. In der Färbung mit COX/SDH sieht man eine gleichmäßige, kräftige Färbung der Muskelfasern, was für eine funktionierende Mitochondrien-Funktion spricht. Die Färbung mit C5b-9 zeigt keine Ablagerungen auf Kapillaren oder dem Sarkolemm der Muskelfasern. Im gesunden Muskelgewebe sieht man weder CD8⁺ Zellen noch CD68⁺ Makrophagen. MHC Klasse I oder MHC Klasse II zeigen keine Überexpression, weder auf Kapillaren noch auf Fasern des perifaszikulären Bereichs.

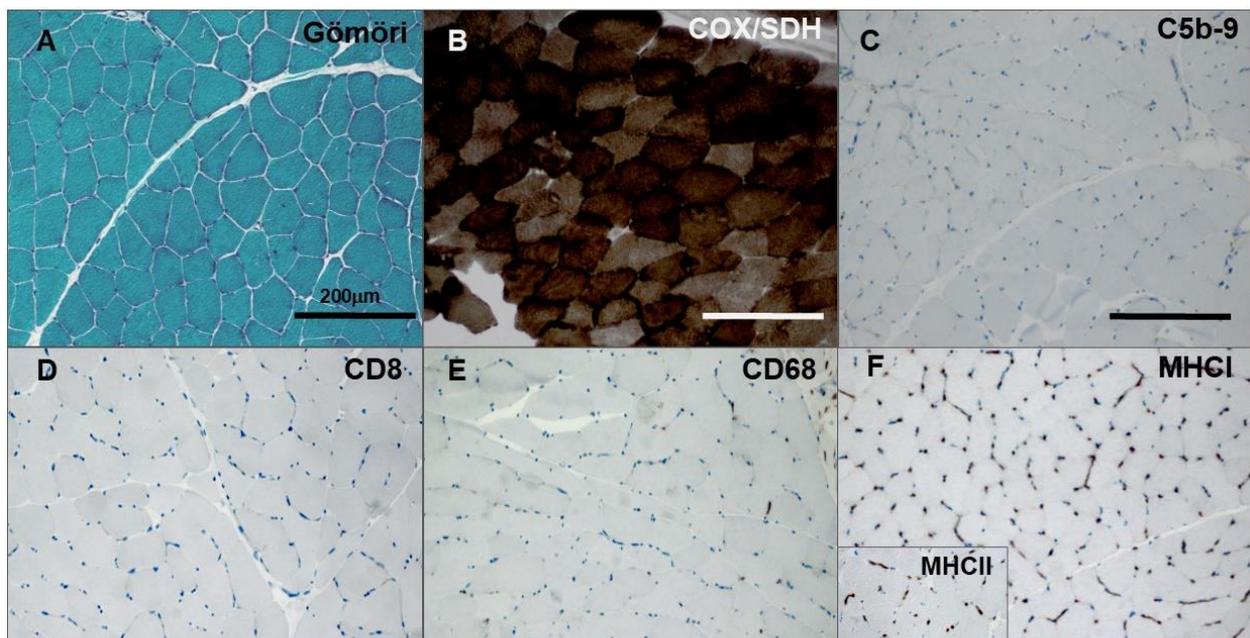


Abbildung 2: Repräsentative Färbungen in einer Muskelbiopsie eines gesunden Kontrollpatienten

(A) In der Gömöri Trichrome Färbung sieht man eine regelhaft geringe Faserkalibervarianz polygonaler Muskelfasern ohne perifaszikuläre Atrophie oder Muskelfasernekrosen, keine sarkoplasmatischen Auffälligkeiten, zartes Perimysium (Originalvergrößerung x200). **(B)** Regelmäßige enzymhistochemische Färbereaktion von dunklen Typ 1 Fasern und helleren Typ 2 Fasern mit COX/SDH, keine ragged brown fibers, keine COX-Defizienz, keine COX-negativen SDH positiven Fasern (Originalvergrößerung x200). **(C)** Keine Komplementablagerungen (C5b-9) auf den Kapillaren oder dem Sarkolemm von Muskelzellen (Originalvergrößerung x200). **(D)** Keine CD8⁺ T-Zellen (Originalvergrößerung x200). **(E)** Keine CD68⁺ Makrophagen (Originalvergrößerung x200). **(F)** MHC Klasse I Färbung mit gleichmäßiger Färbung auf den Kapillaren (physiologisch) (Originalvergrößerung x200). Das Inlay zeigt die Färbung mit MHC Klasse II– ebenfalls mit physiologischer Kapillarfärbung (Originalvergrößerung x400).

4.2.2. Charakterisierung von Dermatomyositis Patienten

Um zunächst die grundlegenden Charakteristika der einzelnen AK-Subgruppen zu visualisieren wurden eine Reihe von histologischen Färbungen durchgeführt. In den Färbungen mit HE oder Gömöri zeigte sich, dass Muskelbiopsien von Mi-2⁺ Patienten eine fokale perifaszikuläre Pathologie aufwiesen, bestehend aus Kapillarverlust und einer Atrophie der Muskelfasern, welche meist in der perifaszikulären Region lokalisiert waren. Darüber hinaus zeigten sich teilweise fokal nekrotische Fasern, einzeln oder in Gruppen gelagert (siehe Abbildung 3, **A**). Auch bei Muskelbiopsien von TIF-1 γ ⁺ Patienten war eine perifaszikuläre Pathologie in Form von Muskelfaseratrophien mit einem nach zentrofaszikulär abnehmenden Gradienten zu beobachten, (siehe Abbildung 3, **B**). Im Vergleich dazu war die Muskelfaseratrophie im perifaszikulären Bereich bei MDA5⁺ Patienten- wenn vorhanden- nur minimal, und allenfalls fokal ausgeprägt (siehe, Abbildung 3, **C**). In der Färbung mit COX/SDH zeigte sich bei den Gruppen mit Mi-2⁺ Patienten und TIF-1 γ ⁺ Patienten eine deutliche Blässe der COX Reaktion bei relativ erhaltener SDH Reaktion im Bereich der perifaszikulär gelegenen atrophien Muskelfasern, was auf eine gestörte Funktion der mitochondrialen Atmungskette- und somit auf Zellschäden- insbesondere bei den TIF-1 γ ⁺ Patienten hindeutet (siehe Abbildung 3, **D** und **E**).

Komplementablagerungen (C5b-9) befanden sich bei Mi-2⁺ Patienten prädominant auf dem Sarkolemm in perifaszikulären Arealen, nachrangig auch auf Kapillaren (siehe Abbildung 3, **G**), bei TIF-1 γ ⁺ Patienten jedoch prädominant auf einer Vielzahl von Kapillaren (siehe Abbildung 3, **H**). Muskelbiopsien der Gruppe mit MDA5⁺ Patienten zeigten nur vereinzelt sarkolemmale Komplementablagerungen, keine kapilläre Färbereaktion (siehe Abbildung 3, **I**).

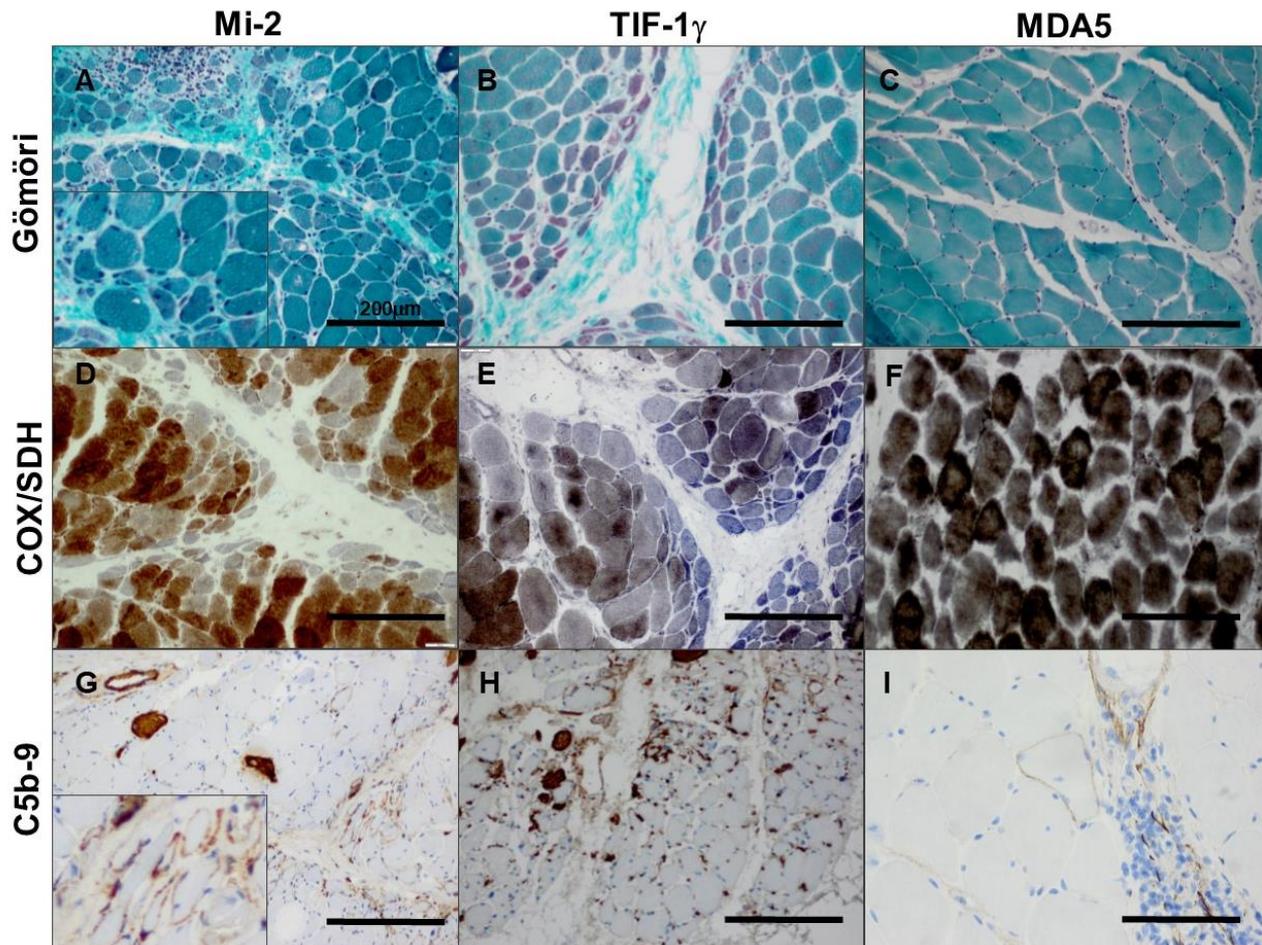


Abbildung 3: Grundlegendes Schädigungsmuster in der Skelettmuskulatur bei DM Patienten mit unterschiedlichen Autoantikörpern (I)

(A) Ausgeprägte perifaszikuläre Atrophie von Muskelfasern in der modifizierten Gömöri Trichrom Färbung bei einem charakteristischen Fall eines Mi-2⁺ Patienten (Originalvergrößerung x200). (B) ebenfalls ausgeprägte perifaszikuläre Atrophie von Muskelfasern in der modifizierten Gömöri Trichrom Färbung bei einem charakteristischen Fall eines TIF-1 γ ⁺ Patienten (Originalvergrößerung x200) (C) Keine relevante Muskelfaseratrophie bei einem charakteristischen Fall eines MDA5⁺ Patienten (Originalvergrößerung x200) (D, E) Blässe von COX in perifaszikulären Arealen (insbesondere bei einem TIF-1 γ ⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x). (F) Regelmäßiges Färbemuster für die kombinierte COX/SDH Färbung bei einem MDA5⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x). (G) Komplementablagerungen (C5b-9) auf dem Sarkolemm und vereinzelt auch auf Kapillaren bei Mi-2⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x, Inset Zoom In). (H) Komplementablagerungen bei TIF-1 γ ⁺ Patienten prädominant auf Kapillaren (Originalvergrößerung 200x). (I) Sarkolemmale Komplementablagerung auf lediglich einer perifokalen Faser bei einem MDA5⁺ Patienten (Originalvergrößerung x400).

Bei Mi-2⁺ Patienten zeigte sich ein intensives inflammatorisches Infiltrat, welches zumeist im Perimysium, teilweise fokal auch im Endomysium lokalisiert war (siehe Abbildung 4, **A**). Auch die Muskelbiopsien der TIF-1 γ ⁺ Patienten wiesen entzündliche Infiltrate auf, wobei diese nicht so intensiv ausgeprägt waren wie bei Mi-2⁺ Patienten und sich eher diffus und vereinzelt im Peri- und Endomysium verteilten (siehe Abbildung 4, **B**). In beiden Antikörpergruppen konnten in diesen Infiltraten CD8⁺ Zellen gefunden werden. Bei MDA5⁺ Patienten zeigten sich selten Entzündungsinfiltrate, vereinzelte CD8⁺ Zellen im Perimysium perivaskulär konnten beobachtet werden (siehe Abbildung 4, **C**).

In allen Muskelbiopsien der Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patientengruppen konnte eine Hochregulierung von MHC Klasse I, jedoch nur in wenigen Fällen ganz singulär von MHC Klasse II Molekülen auf der Oberfläche von Muskelfasern festgestellt werden (siehe Abbildung 4, **D** und **G** für Mi-2⁺ Patienten, **E** und **H** für TIF-1 γ ⁺ Patienten). Die Anfärbung bei MHC Klasse I zeigte sich immer kräftig vor allem in der perifaszikulären Region mit einem sinkenden Gradienten der Färbung zum Zentrum des Faszikels hin, was zu einem perifaszikulärem Enhancement führte. Bei MDA5⁺ Patienten fand sich eine Anfärbung von MHC Klasse I mit diffuser relativ schwacher Verteilung aber keine MHC Klasse II Färbung der Fasern (siehe Abbildung 4, **F** und **I**).

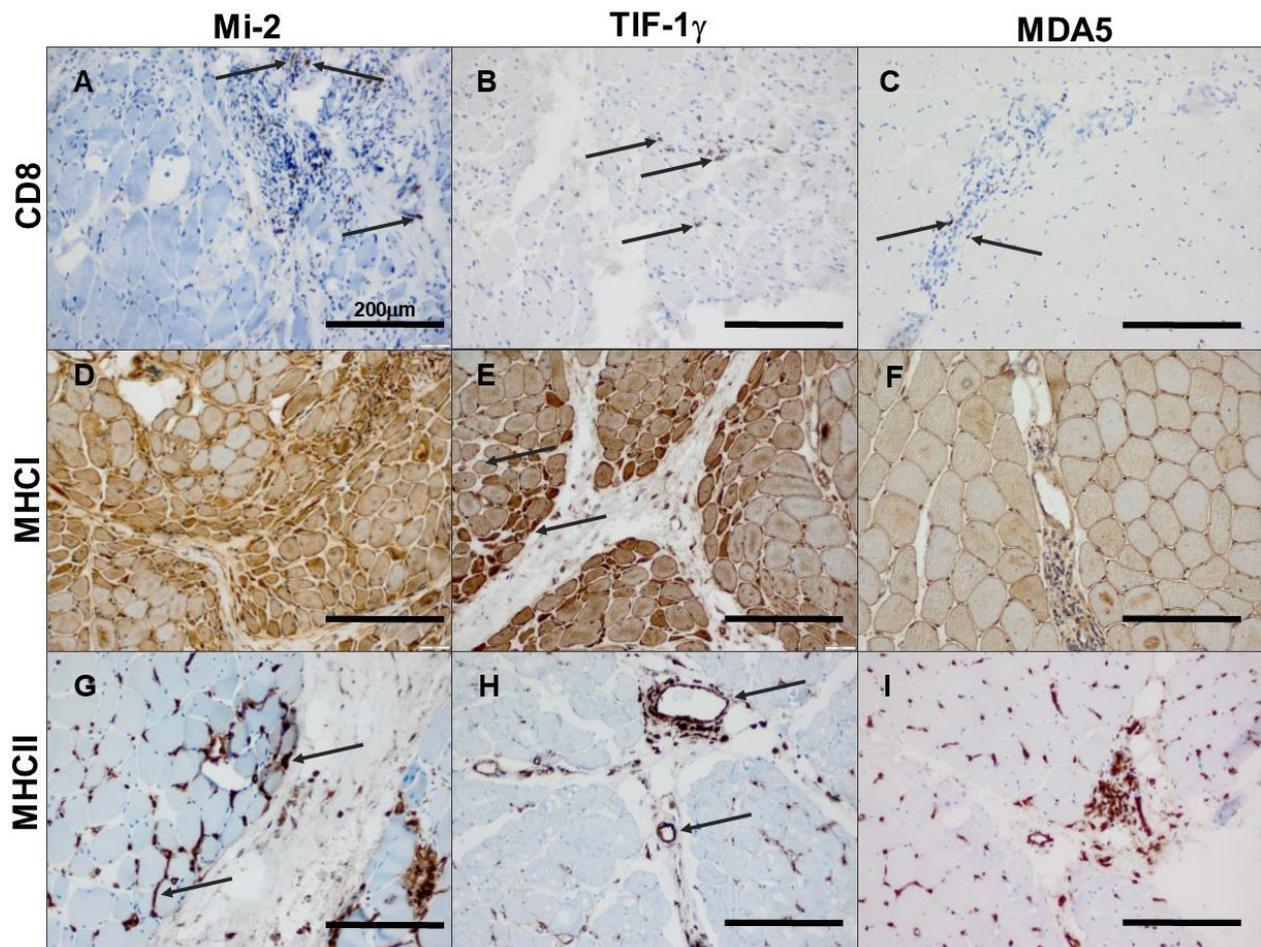


Abbildung 4: Grundlegendes Schädigungsmuster in der Skelettmuskulatur bei DM Patienten mit unterschiedlichen Autoantikörpern (II)

(A) Ausgeprägtes inflammatorisches Infiltrat im perimysialen perivaskulär gelegen Bereich bestehend aus CD8⁺ T-Zellen bei Mi-2⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x). (B) Singuläre CD8⁺ Zellen im Endomysium bei TIF-1 γ ⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x). (C) Vereinzelte CD8⁺ Zellen im perimysialen Bereich bei MDA5⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x). (D, E) Perifaszikuläres Enhancement: perifaszikuläre Färbung von MHC Klasse I mit abnehmenden Gradient zur zentrofaszikulären Region hin bei Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x). (F) gleichmäßige relativ schwache Färbung von MHC Klasse I bei MDA5⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x). (G, H) und (I) keine sarkolemmale MHC Klasse II Färbung auf perifaszikulären Muskelfasern (Originalvergrößerung 200x).

4.3. Zusammenfassung der klinischen und histologischen Ergebnisse

Die Patientenkohorten der verschiedenen Antikörpersubgruppen unterschieden sich wesentlich in Hinblick auf muskuläre Symptome wie Muskelschwäche und Muskelschmerzen sowie in Bezug auf extramuskuläre Symptome wie Art und Ausprägung der Hautmanifestation, Lungenbeteiligung und das Auftreten von Neoplasien. Mi-2⁺ Patienten und TIF-1 γ ⁺ Patienten zeigten häufig klassische DM Hautmanifestationen wie Gottron-Zeichen, teils massive Erytheme an Gesicht, Dekolleté, Oberarmen und Oberschenkeln oder auch livide Hautverfärbungen. Im Gegensatz dazu zeigten MDA5⁺ Patienten zusätzlich auch atypische Hautveränderungen wie Ulzerationen und Kalzifikationen. Muskelsymptome in Form von Muskelschwäche, die bis zur Tetraparese reichte, und Muskelschmerzen waren bei allen Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patienten vorhanden (bei einem TIF-1 γ ⁺ Patienten lagen keine Angaben vor). Nur etwa die Hälfte aller MDA5⁺ Patienten wiesen Muskelsymptome in Form von Muskelschwäche oder Muskelschmerzen auf. Neoplasien wiesen nur Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patienten (vier Mi-2⁺ Patienten und sieben TIF-1 γ ⁺ Patienten). Kein MDA5⁺ Patienten besaß eine onkologische Erkrankung. Eine ILD konnte bei sieben von neun MDA5⁺ Patienten nachgewiesen werden. Nur ein weiterer Patient erkrankte an ILD, dies war ein Mi-2⁺ Patient.

Mi-2⁺ Patienten zeigten insgesamt in den meisten untersuchten histologischen Eigenschaften einen wesentlich stärkeren Grad der Betroffenheit als TIF-1 γ ⁺ Patienten oder MDA5⁺ Patienten. Muskelbiopsien von MDA5⁺ Patienten wiesen nur geringfügige Auffälligkeiten auf. Bei Mi-2⁺ Patienten und TIF-1 γ ⁺ Patienten waren zumeist ähnliche Merkmale vorhanden: weniger COX Blässe bei Mi-2⁺ Patienten, mehr Entzündung perifaszikulär bei Mi-2⁺ Patienten, mit der Ausnahme der Komplementablagerungen, welche in den beiden unterschiedlichen Gruppen dezidiert andere Lokalisationen betrafen (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19 Zusammenfassung der histologischen und klinischen Ergebnisse

| | | Mi-2 | TIF-1 γ | MDA5 |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------|-------------------------|------|
| Klinik | Muskelsymptome | ↑↑↑ | ↑↑ | - |
| | CK-Erhöhung | ↑↑↑ | ↑ | - |
| | Hautbeteiligung | ↑↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑ |
| | Lungenbeteiligung | - | - | ↑↑↑ |
| | Neoplasie | - | ↑↑↑ | - |
| Histologie | PFP | ↑↑↑ | ↑↑↑ | ↑ |
| | Inflammation | ↑↑ | ↑ | - |
| | MHC Klasse I | ↑↑↑ | ↑↑↑ | ↑ |
| | MHC Klasse II | minimal | - | - |
| | Komplementablagerungen (C5b-9) | ↑↑ auf Sarkolemm | ↑↑ auf Kapillaren | - |

4.4. Lokalisierung und Expression von PD1 und seinen Ligand L1 und L2

Nachdem die grundsätzliche Charakterisierung bereits deutliche Unterschiede in der Morphologie gezeigt hatte, untersuchten wir die Relevanz des Immuncheckpoint-Systems PD1, PD-L1 und PD-L2 auf histologischer Ebene.

In den immunhistochemischen Färbungen zeigten sich viele PD1⁺ Zellen. Bei Mi-2⁺ Patienten lagen diese Zellen meist in Clustern in endomysialen Bereichen oder auch perivasaal im Perimysium. In der Subgruppe der TIF-1 γ ⁺ Patienten waren PD1⁺ Zellen weniger häufig detektierbar. In Skelettmuskelbiopsien von MDA5⁺ Patienten waren allenfalls fokal vereinzelte PD1⁺ Zellen sichtbar (siehe Abbildung 5).

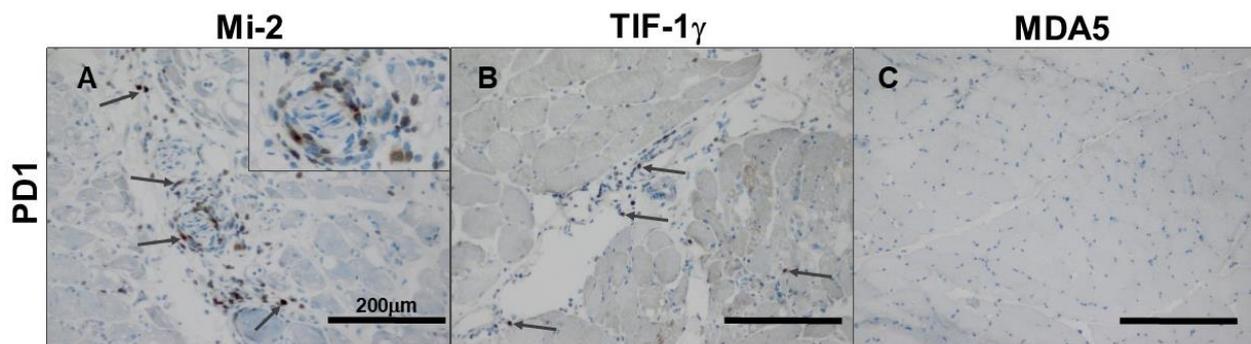


Abbildung 5: PD1⁺ Zellen in Skelettmuskelbiopsaten bei Patienten mit unterschiedlichen DM Autoantikörpern

(A) Zahlreiche PD1⁺ Zellen im Bereich des Perimysiums mit Ausbreitung ins Endomysium bei Mi-2⁺ Patienten mit AK (Originalvergrößerung 200x). **(B)** Singuläre PD1⁺ Zellen im perimysialen Bereich bei TIF-1 γ ⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x). **(C)** Nur vereinzelt PD1⁺ Zellen bei MDA5⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x); Pfeile zeigen exemplarisch positiv gefärbte Zellen

Zur besseren Quantifizierung wurde die Menge der PD1⁺ Zellen ausgezählt. Es zeigte sich, dass die Zahlen von PD1⁺ Zellen in den AK Subgruppen von Mi-2 und TIF-1 γ signifikant höher waren als bei Patienten mit Anti-MDA5 Antikörpern (siehe Abbildung 6).

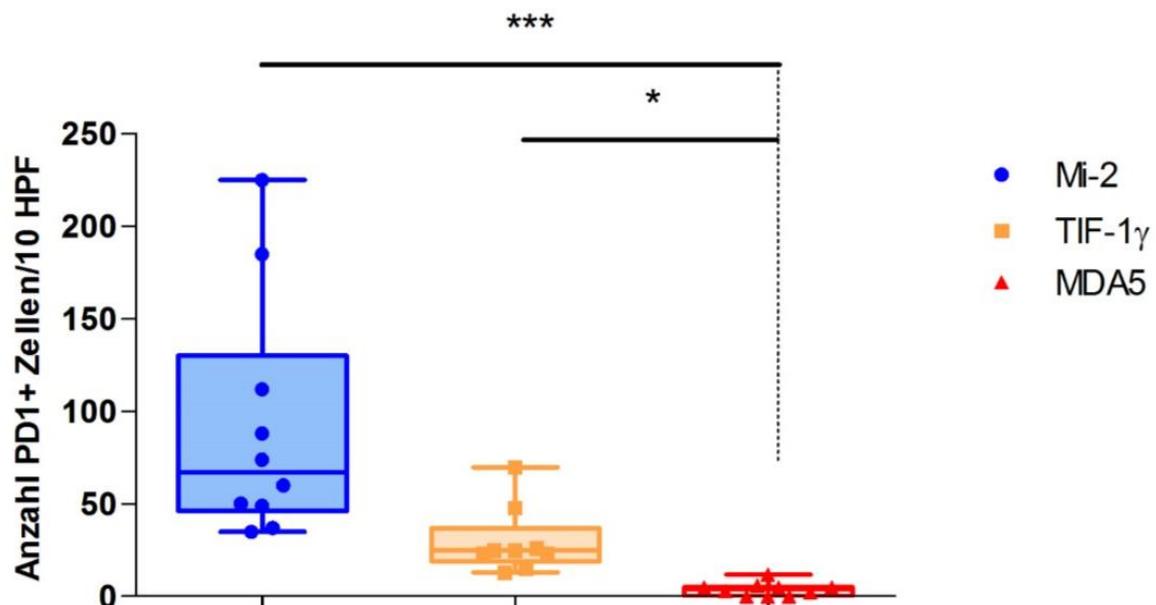


Abbildung 6: Quantifizierung PD1⁺ Zellen/10 HPF in Skelettmuskelbiopsaten von Patienten mit DM mit unterschiedlichen Autoantikörpern

Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patienten wiesen signifikant mehr PD1⁺ Zellen/10 HPF auf als MDA5⁺ Patienten mit AK. (* $\triangleq p < 0.05$, ** $\triangleq p < 0.01$, *** $\triangleq p < 0.001$).

Zwischen den AK Subgruppen zeigten sich wiederum deutliche Differenzen in Bezug auf positive Strukturen für den Liganden L1. Bei den positiven Strukturen handelte es sich vermutlich um Makrophagen oder auch allgemein um APCs. Diese waren bei Mi-2⁺ Patienten reichlich vorhanden und lagerten häufig in Clustern zusammen, bei TIF-1 γ ⁺ Patienten fand man häufig vereinzelte Zellen im Endo- und Perimysium. Bei MDA5⁺ Patienten konnte man lediglich singuläre Immunzellen beobachten. Bei Mi-2⁺ Patienten waren signifikant mehr PD-L1⁺ Zellen in Skelettmuskelbiopsaten vorhanden als dies bei Patienten mit MDA5⁺ AK der Fall war. PD-L2 konnte auf dem Sarkolemm von Muskelfasern nachgewiesen werden. Bei Mi-2⁺ Patienten war PD-L2 meist diffus kräftig auf dem Sarkolemm vorhanden, bei TIF-1 γ ⁺ Patienten sah man eine größere Bandbreite an Positivität, die von schwacher sarkolemmaler Färbung bis hin zu diffus kräftiger Färbung reichte. MDA5⁺ Patienten wiesen PD-L2 nur schwach auf dem Sarkolemm auf.

Im Falle des Liganden L2 wiesen wiederum Mi-2⁺ Patienten signifikant mehr positive Strukturen auf als MDA5⁺ Patienten. (siehe Abbildung 7, **A** und **B** sowie Abbildung 8)

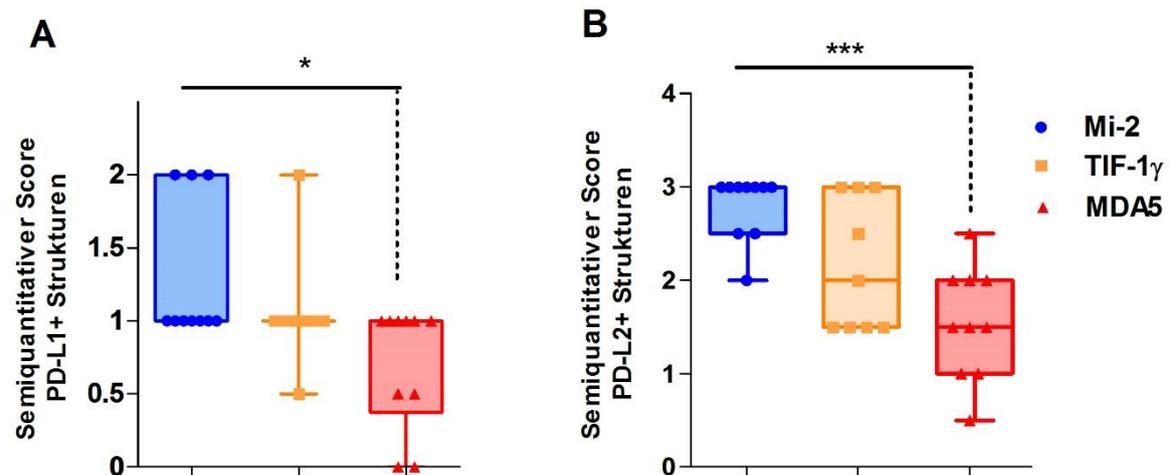


Abbildung 7: PD-L1⁺ und PD-L2⁺ Strukturen in Skelettmuskelbiopsaten von Patienten mit DM und unterschiedlichen Autoantikörpern

(A) Zeigt PD-L1⁺ Strukturen bei Mi-2⁺ Patienten, TIF-1 γ ⁺ Patienten und MDA5⁺ Patienten. Mi-2⁺ Patienten wiesen signifikant mehr PD-L1 positive Strukturen auf als MDA5⁺ Patienten. Dabei handelte es sich um wohl um Makrophagen und APCs. **(B)** Zeigt PD-L2⁺ Strukturen bei Mi-2⁺ Patienten, TIF-1 γ ⁺ Patienten und MDA5⁺ Patienten. Mi-2⁺ Patienten zeigten signifikant mehr PD-L2 positive Strukturen auf als MDA5⁺ Patienten. Dabei handelte es sich um das Sarkolemm von Muskelfasern. (* $\triangleq p < 0.05$, ** $\triangleq p < 0.01$, *** $\triangleq p < 0.001$).

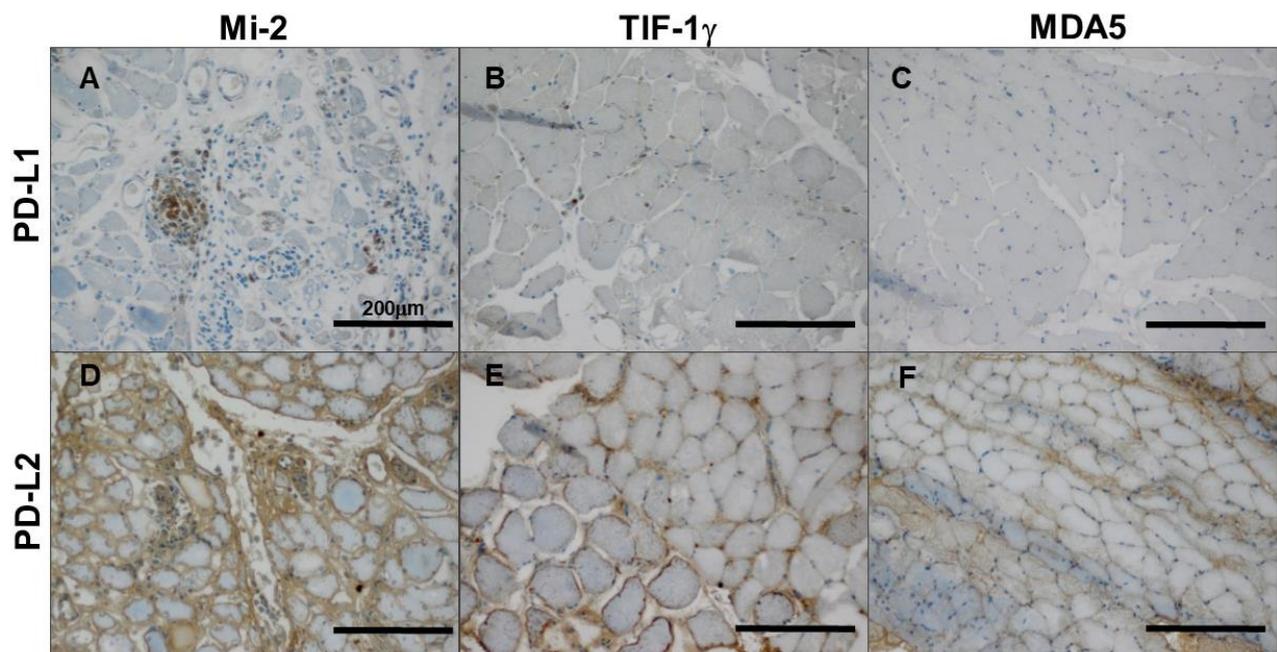


Abbildung 8: PD-L1 und PD-L2 positive Strukturen bei Patienten mit unterschiedlichen DM Autoantikörpern

(A) Infiltrat mit einer Vielzahl PD-L1⁺ Zellen bei Mi-2⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x). **(B)** Vereinzelt PD-L1⁺ Zellen im Endomysium der Muskelfasern bei TIF-1 γ ⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x). **(C)** keine PD-L1⁺ Zellen bei MDA5⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x). **(D)** PD-L2 Färbung diffus kräftig auf dem Sarkolemm von Muskelfasern bei Mi-2⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x). **(E)** diffus kräftige Färbung von PD-L2 auf dem Sarkolemm von Muskelfasern bei TIF-1 γ ⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x). **(F)** diskrete sarkolemmale positive Färbung von PD-L2 auf einzelnen Muskelfasern bei MDA5⁺ Patienten (Originalvergrößerung 200x).

Mittels PCR Analyse zeigte sich auf mRNA Ebene im Trend ein ähnliches Muster was das Ausmaß der Genexpression der einzelnen Moleküle im Gesamtgewebe anging: die Expression von *PD1* war in der Gruppe der Mi-2⁺ Patienten mit AK im Vergleich zu Patienten mit MDA5 AK signifikant verstärkt zu finden, während die Expression von *PDL1* keine signifikanten Unterschiede zwischen den AK Subgruppen aufwies. Bei MDA5⁺ Patienten mit positivem war bei den meisten Patienten keine Expression von *PD1* detektierbar. Die Expression von *PDL2* war wiederum in der Gruppe der Mi-2⁺ Patienten am stärksten ausgeprägt, schwächer bei TIF-1 γ ⁺ Patienten und am geringsten bei MDA5⁺ Patienten, wobei die Gruppen für die *PDL2* Expression keine signifikanten Unterschiede zueinander aufwiesen (siehe Abbildung 9).

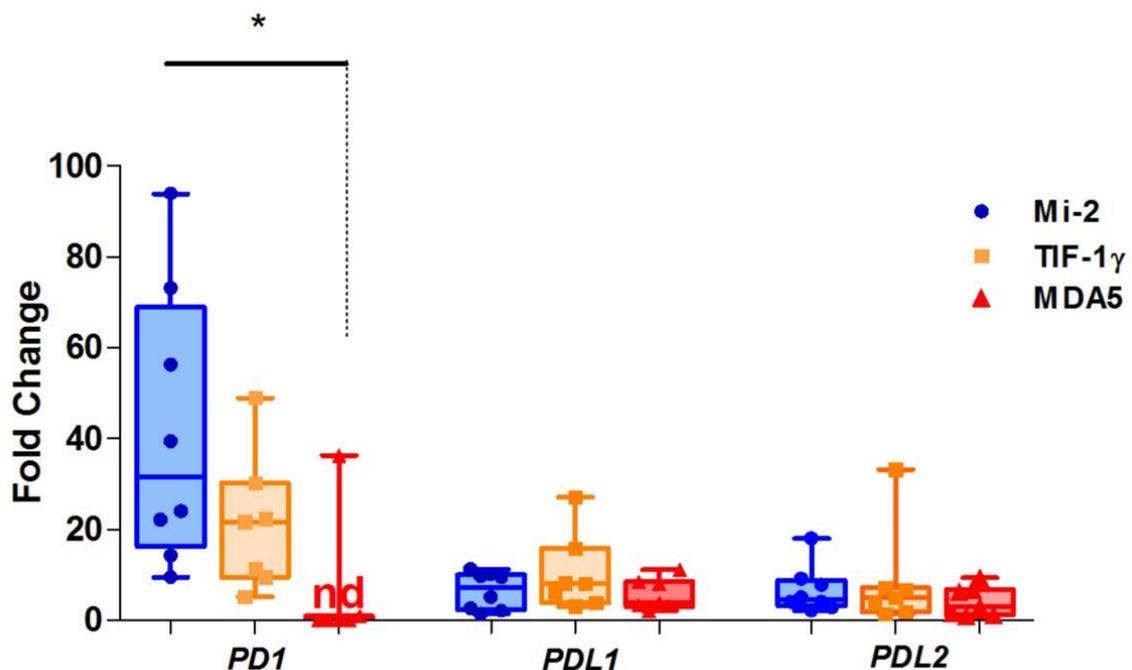


Abbildung 9: Genexpressionlevels für PD1, PD-L1 und PD-L2 bei Patienten mit DM

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der *PD1* Expression zwischen Mi-2⁺ Patienten und MDA5⁺ Patienten. Die Expression von *PDL1* und *PDL2* waren innerhalb der AK Subgruppen homogen. nd=nicht detektierbar (* $\triangleq p < 0.05$, ** $\triangleq p < 0.01$, *** $\triangleq p < 0.001$).

Zur weiteren Charakterisierung, welche Zellen oder Strukturen eine Expression von PD1, PD-L1 und PD-L2 aufwiesen, wurde eine Vielzahl von Färbungen angefertigt. Auch hier zeigten sich klare Unterschiede zwischen den Antikörpersubgruppen.

So ließ sich in Skelettmuskelbiopsien von Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patienten PD1 auf einer Vielzahl von CD3⁺ T-Zellen nachweisen (siehe Abbildung 10, **A** und **B**). Es zeigte sich allerdings auch eine Population von CD3⁺ T-Zellen die PD1 negativ waren. Dieses Merkmal war in beiden AK Subgruppen zu beobachten, wobei bei Mi-2⁺ Patienten die Anzahl der CD3⁺ Zellen insgesamt und auch die Anzahl der PD1⁺/CD3⁺ Zellen höher war. Bei Muskelbiopsien von TIF-1 γ ⁺ Patienten konnten ebenfalls diese zwei T-Zell Populationen gefunden werden, wobei CD3⁺ T-Zellen insgesamt wie oben bereits erwähnt weniger häufig auffindbar waren als bei der Gruppe der Mi-2⁺ Patienten. Bei MDA5⁺ Patienten konnten keine CD3⁺ T-Zellen mit PD1 Expression nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10, **C**).

Darüber hinaus konnten in allen AK Subgruppen PD1 auf singulären CD20⁺ B-Zellen gezeigt werden (siehe Abbildung 10, **D**, **E** und **F**). Bei Mi-2⁺ Patienten waren diese Zellen häufig in Clustern im perimysialen Bereich lokalisiert. In Muskelbiopsien von TIF-1 γ ⁺ und MDA5⁺ Patienten waren diese Zellen sehr selten auffindbar und nur vereinzelt.

CD68⁺ Makrophagen mit PD1-Expression zeigten sich in den Gruppen mit Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patienten (siehe Abbildung 10, **G** und **H**). Man konnte wiederum feststellen, dass es sowohl eine Makrophagen-Population von PD1⁺/CD68⁺ sowie eine Population von CD68⁺ Zellen, die die Oberflächenexpression von PD1 nicht hochreguliert hatten, gab. Bei MDA5⁺ Patienten sah man vereinzelt Makrophagen im Peri- und Endomysium, eine PD1-Expression dieser Makrophagen ließ sich nicht detektieren (siehe Abbildung 10, **I**).

Zusammengefasst zeigten sich bei der Subgruppe der Mi-2⁺ Patienten insgesamt viele Immunzellen, einige PD1 co-exprimierende T-Zellen, weniger PD1 co-exprimierende B-Zellen und vereinzelt PD1 co-exprimierende Makrophagen. Skelettmuskelbiopsien von TIF-1 γ ⁺ Patienten wiesen im Verhältnis zu Mi-2⁺ Patienten ein schwächeres inflammatorisches Infiltrat auf. Aber auch hier waren innerhalb dieses Infiltrates vor allem PD1 co-exprimierende T-Zellen vorhanden. Bei MDA5⁺ Patienten konnten keine PD1 co-

exprimierende T-Zellen singuläre PD1 co-exprimierende B-Zellen werden. Es zeigten sich vereinzelt Makrophagen ohne PD1 Co-Expression.

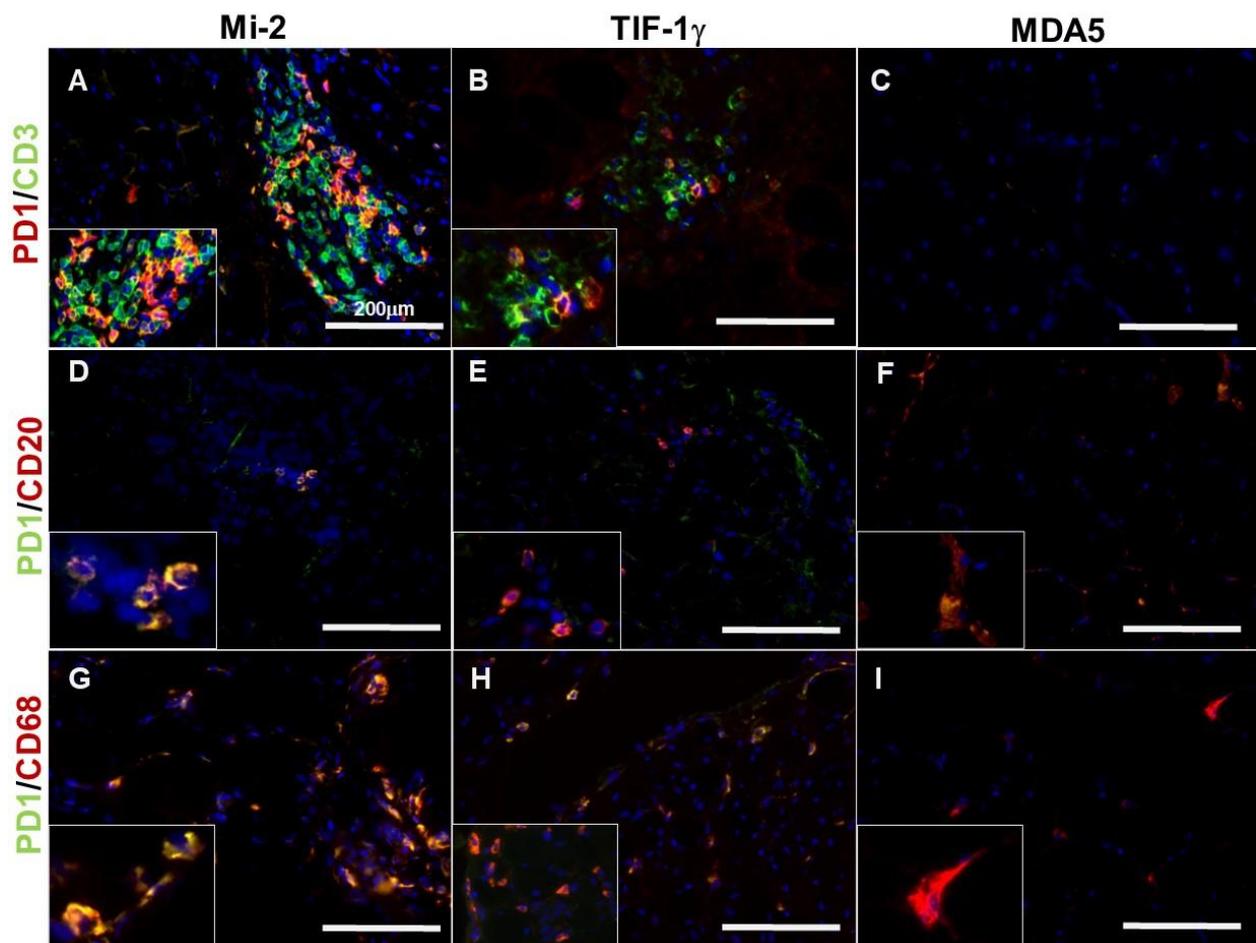


Abbildung 10: Lokalisation von PD1 auf Immunzellen in Skelettmuskelbiopsaten bei Patienten mit DM

Bei Mi-2⁺ Patienten zeigen sich viele Immunzellen, die PD1 positiv sind. **(A)** CD3⁺ T Zellen exprimieren partiell PD1 (Originalvergrößerung 200x). **(B)** Vereinzelte CD3⁺ Zellen exprimieren PD1, auch hier zeigen sich viele T-Zellen ohne PD1 Positivität (Originalvergrößerung 200x). **(C)** Weder T-Zellen noch PD1⁺ Zellen sind sichtbar (Originalvergrößerung 200x). **(D)** Vereinzelt zeigen sich auch B-Zellen mit PD1 Rezeptor Co-Expression. (Originalvergrößerung 200x). **(E)** Vereinzelt zeigen sich PD1⁺ B-Zellen (Originalvergrößerung 200x). **(F)** selten sieht man einzelne PD1⁺ B-Zellen (Originalvergrößerung 200x) **(G)** Häufig sieht man PD1⁺ Makrophagen, doch auch hier zeigt sich eine Kohorte ohne PD1 Rezeptor (Originalvergrößerung 200x). Patienten mit TIF-1 γ AK zeigen seltener Zellen mit PD1 Rezeptor **(H)** Eine Vielzahl von Makrophagen sind PD1⁺, eine zweite Makrophagen Kohorte exprimiert diesen Rezeptor nicht (Originalvergrößerung 200x). Bei MDA5⁺ Patienten zeigen sich nahezu keine PD1⁺ Zellen. **(I)** Selten vorkommende Makrophagen sind nicht PD1⁺ (Originalvergrößerung 200x).

Zuletzt sollte gezeigt werden, welche Zellen beziehungsweise welche Strukturen die Liganden PD-L1 und PD-L2 exprimieren. Für den Liganden 1 wurden verschiedene Co-Lokalisationen überprüft. In der Mi-2 AK-Subgruppe konnte PD-L1 auf CD68⁺ Makrophagen dargestellt werden (siehe Abbildung 11, **A**). Es zeigte sich, dass es sowohl eine Population von CD68⁺ Zellen gab, die PD-L1 exprimierten, als auch eine Subpopulation, die dies nicht tat. TIF-1 γ ⁺ Patienten oder MDA5⁺ Patienten zeigten keine Makrophagen mit PD-L1 Expression (siehe Abbildung 11, **B** und **C**). PD-L1 ließ sich allerdings auf CD4⁺ Zellen nachweisen: dies war sowohl bei Mi-2⁺ als auch bei TIF-1 γ ⁺ Patienten der Fall (siehe Abbildung 11, **D** und **E**), jedoch waren CD4⁺/PD-L1⁺ Zellen bei TIF-1 γ ⁺ Patienten deutlich rarer auffindbar. MDA5⁺ Patienten wiesen keine T-Helferzellen mit PD-L1 Expression auf (siehe Abbildung 11, **F**). Eine Lokalisation von PD-L1 auf CD20⁺ B Zellen, BDCA2⁺ oder CD123⁺ (pDCs) konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

In der Subgruppe der Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patienten konnte PD-L2 auf CD20⁺ B-Zellen nachgewiesen werden, wobei bei TIF-1 γ ⁺ Patienten diese Zellen viel seltener aufzufinden waren (siehe Abbildung 11, **G** und **H**). Bei MDA5⁺ Patienten konnte diese Co-Lokalisation nicht gefunden werden (siehe Abbildung 11, **I**). Eine Lokalisation auf CD4⁺, CD68⁺, CD123⁺ oder BDCA2⁺ Zellen konnte für den Liganden 2 nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt war in der Gruppe der Mi-2⁺ Patienten PD-L1 vor allem auf CD4⁺T-Helferzellen und einigen Makrophagen zu finden. PD-L2 wurde auf einigen B-Zellen exprimiert. Bei Skelettmuskelbiopsien von TIF-1 γ ⁺ Patienten war PD-L1 nur auf vereinzelt T-Helferzellen zu finden. Es gab B-Zellen, die PD-L2 exprimierten. MDA5⁺ Patienten zeigten keine Immunzellen mit Expression von Liganden des PD1 Signalwegs.

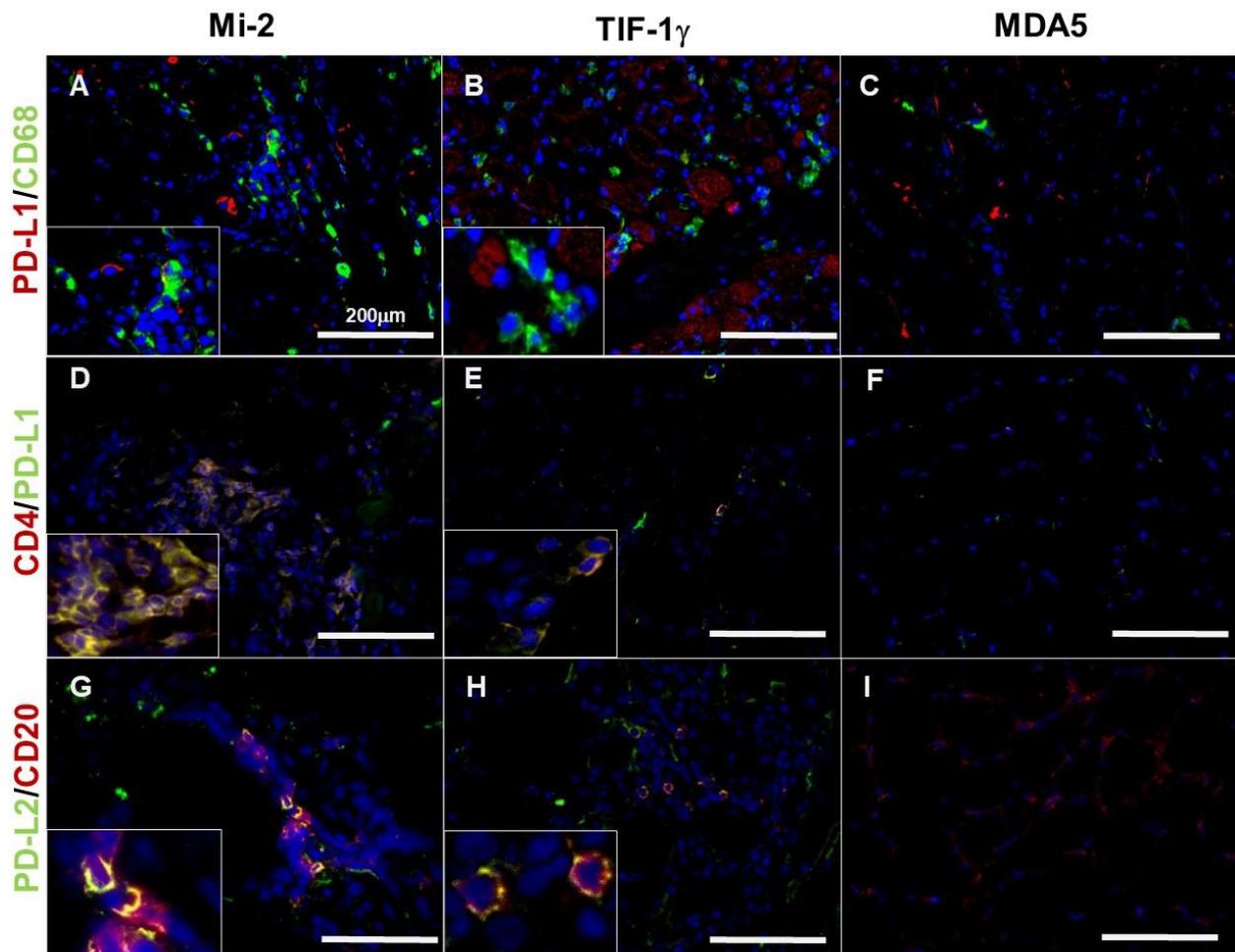


Abbildung 11: Lokalisation von PD-L1 und PD-L2 in Skelettmuskelbiopsaten bei Patienten mit DM

Patienten mit DM distinktes Muster für die Expression der Liganden. **(A)** Makrophagen sind teilweise positiv für PD-L1 (Originalvergrößerung 200x). **(B)** Bei TIF-1 γ ⁺-Patienten lässt sich PD-L1 nicht auf Makrophagen nachweisen (Originalvergrößerung 200x). **(C)** Bei MDA⁺-Patienten zeigten sich keine Co-Lokalisation für PD-L1 mit CD68⁺ oder CD4⁺-Zellen. (Originalvergrößerung 200x). **(D)** viele CD4⁺-Zellen exprimieren PD-L1 (Originalvergrößerung 200x). **(E)** Selten finden sich Areale, in denen sich T-Helferzellen mit PD-L1 nachweisen lassen (Originalvergrößerung 200x). **(F)** Bei MDA⁺-Patienten zeigt sich keine Co-Lokalisation für PD-L1 CD4⁺-Zellen. (Originalvergrößerung 200x). **(G)** PD-L2 lässt sich hingegen auf einigen CD20⁺-Zellen nachweisen (Originalvergrößerung 200x). **(H)** PD-L2 wird von einigen B-Zellen exprimiert (Originalvergrößerung 200x). **(I)** Es zeigten sich keine CD20⁺-Zellen. (Originalvergrößerung 200x).

4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse zu dem Immuncheckpoint-Inhibitor PD1 und seinen Liganden

Die verschiedenen durchgeführten Färbungen führten zu dem Ergebnis, dass in Skelettmuskelbiopsien von Patienten mit DM verschiedene Immunzellen PD1, PD-L1 und PDL2 exprimieren. Es gibt jedoch klare Unterschiede in Bezug auf diese Eigenschaften zwischen den AK Subgruppen (siehe Tabelle 20). Die Gruppe der Mi-2⁺ Patienten zeigte durchschnittlich die meisten PD1⁺ Zellen. In den semiquantitativen Scores für die Liganden L1 und L2 zeigte sich, dass Mi-2⁺ Patienten die meisten positiven Strukturen aufwiesen, gefolgt von der Subgruppe der TIF-1 γ ⁺ Patienten. MDA5⁺ Patienten wiesen die geringsten PD1⁺ Zellzahlen auf, sowie die geringsten PD-L1⁺ und PD-L2⁺ Strukturen. Dieses Muster konnte durch qPCR auf molekularer Ebene bestätigt werden.

Tabelle 20: Lokalisation und Genexpressionslevel von PD1, PD-L1 und PD-L2

| | | Mi-2 | TIF-1 γ | MDA5 |
|----------------------|--------------------|------|----------------|------|
| Lokalisation | | | | |
| PD1 | CD3 ⁺ | ↑↑↑ | ↑↑ | - |
| | CD20 ⁺ | ↑↑ | ↑ | - |
| | CD68 ⁺ | ↑↑↑ | ↑↑↑ | - |
| PD-L1 | CD4 ⁺ | ↑↑ | ↑ | - |
| | CD68 ⁺ | ↑↑ | - | - |
| | CD20 ⁺ | - | - | - |
| | CD123 ⁺ | - | - | - |
| | BDCA2 ⁺ | - | - | - |
| PD-L2 | CD4 ⁺ | - | - | - |
| | CD20 ⁺ | ↑↑ | ↑ | - |
| | CD68 ⁺ | - | - | - |
| | CD123 ⁺ | - | - | - |
| | BDCA2 ⁺ | - | - | - |
| | | Mi-2 | TIF-1 γ | MDA5 |
| Genexpression | <i>PD1</i> | ↑↑↑ | ↑↑ | - |
| | <i>PDL1</i> | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ |
| | <i>PDL2</i> | ↑↑↑ | ↑↑ | ↑↑ |

4.6. Die Rolle des PD1 Signalweges in unterschiedlichen DM Antikörpergruppen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in den Biopsien von Skelettmuskeln von Patienten mit DM, je nach AK Subgruppe, teilweise eine Vielzahl PD1⁺ Immunzellen sowie einige Zellen mit den beiden Liganden PD-L1 und PD-L2 aufwiesen, sollte überprüft werden, ob es dafür eine genetische Grundlage gibt. Um festzustellen, ob eine genetische Veränderung im Genom von Patienten mit DM Ursache für eine Störung im PD1 Signalweg sein könnte, wurde ein Whole-Exome-Sequencing (WES) durchgeführt. Die DNA-Proben von insgesamt 12 Patienten wurden dabei untersucht: vier Patienten waren Mi-2⁺, fünf Patienten waren TIF-1 γ ⁺ und drei Patienten waren MDA5⁺. Bei der Auswahl der Patienten wurde darauf Wert gelegt, dass diese die charakteristischen klinischen und histologischen Merkmale ihrer jeweiligen AK Gruppe aufwiesen. Außerdem mussten die hergestellten DNA-Proben eine Konzentration von mindestens 50ng/ μ l und insgesamt eine Menge von 1 μ g aufweisen. Diese Anforderungen sind notwendig, um akkurate Ergebnisse der WES zu gewährleisten.

Die Analyse der gelieferten WES Daten erfolgte auf zwei verschiedene Arten: zum einen wählten wir eine „unbiased“ Methode ohne Einschränkungen in Bezug auf Art der Vererbung oder Art der Mutation, um alle veränderten Gene unserer untersuchten Proben zu identifizieren und verglichen diese dann untereinander um festzustellen, welche Gene bei allen Patienten verändert waren oder nur in einer AK Gruppe, beziehungsweise in einer AK Gruppe nicht. Die zweite Methode umfasste die Zusammenstellung von Kandidatengenen in Bezug auf den PD1 Signalweg sowie der Gene, die mit dem ISG in Zusammenhang stehen. Diese Liste an Kandidatengenen wurde mit den Genen der Patienten abgeglichen. Ausgeschlossen wurden Gene, die bei mehr als 20 Carriern vorkamen oder deren Kopienzahl <50 waren. Sollten Gene bei über 20 Carriern in der Allgemeinbevölkerung vorkommen, so wären dies häufig anzutreffende Gene, welche wahrscheinlich nicht für die Pathogenese einer seltenen Erkrankung wie der DM verantwortlich sind. Der Cut-Off Wert der Kopienzahl unter 50 wurde gewählt, um sicherzustellen, dass veränderte Gene auch tatsächlich Auswirkungen auf die Expression ihrer Moleküle besitzen (117-119). Die Varianten der Patienten wurden miteinander abgeglichen (siehe Abbildung 1).

Bei den untersuchten Patienten wurden im Durchschnitt 321 veränderte Gene gefunden (siehe Tabelle 21). Auffällig war eine höhere Gesamtanzahl an veränderten Genen in der Subgruppe der MDA5⁺ Patienten, welche jedoch nicht signifikant war.

Tabelle 21: Mutationsload im Genom der untersuchten Patientenmuskeln

| Autoantikörper | Anzahl der veränderten Gene | |
|---------------------------------|-----------------------------|-----|
| Mi-2 | Patient 1 | 280 |
| | Patient 2 | 293 |
| | Patient 3 | 277 |
| | Patient 4 | 273 |
| | Patient 5 | 235 |
| TIF-1γ | Patient 6 | 277 |
| | Patient 7 | 318 |
| | Patient 8 | 260 |
| | Patient 9 | 296 |
| MDA5 | Patient 10 | 487 |
| | Patient 11 | 583 |
| | Patient 12 | 271 |

Bei den identifizierten Mutationen handelt es sich um nicht-synonyme Punktmutationen, die zu einem Aminosäurenwechsel führen und damit die Funktionsfähigkeit des kodierten Proteins beeinträchtigen beziehungsweise aufheben, oder um Nonsense-Mutationen, bei denen es zu einem verfrühten Einbau eines Stoppcodons kommt und damit üblicherweise zu einem kompletten Funktionsverlust des kodierten Proteins.

Zunächst versuchten wir Gene zu identifizieren, die in der gesamten untersuchten Kohorte vorkamen, wobei die Genvarianten nur bei höchstens 20 Carriern in der ExAC Datenbank [<http://exac.broadinstitute.org>, aufgerufen im April 2020] oder der Datenbank des 1,000 Genomes Project [<http://exac.broadinstitute.org>, aufgerufen im April 2020] als bekannte Polymorphismen gelistet sein sollten, um zu garantieren, dass diese in der Bevölkerung selten waren.

Nach Analyse aller 12 Patienten wurden die folgenden sechs Gene identifiziert, welche bei allen untersuchten Patienten der Kohorte verändert waren und somit als potenziell Dermatomyositis-spezifisch angesehen werden können: *ANKRD36*, *CNN2*, *FRG1*,

MUC16, *PRSS3*, *RGPD8*. Ein weiteres Gen- *ANP32B*- war bei 11 Patienten (92%) verändert (siehe Tabelle 22). Für eine Auflistung der Gene mit NM-Nummer, Chromosomenposition, cDNA Position und Effekt der Mutation siehe Abschnitt 4.8., Seite 76.

Aufgrund der distinkten klinischen und histologischen Unterschiede, die in den AK Subgruppen vorkommen, suchten wir ebenso nach Genen, die für die jeweiligen AK spezifisch waren, das heißt nur in einer Gruppe auffallend häufig vorkamen (siehe Tabelle 22). Wir identifizierten zwei Gene für die AK Subgruppe Mi-2 und ein Gen für die AK Subgruppe TIF-1 γ . Bei Mi-2⁺ Patienten kamen die Gene *MPRIP* und *RAI1* spezifisch vor, für TIF-1 γ ⁺ Patienten war dies *USF3*.

Drei weitere Gen, *AGAP4*, *CABP1* und *USP17L10*, kamen in jeweils zwei AK Gruppen vor: *AGAP4* und *USP17L10* bei Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patienten und *CABP1* bei Mi-2⁺ und MDA5⁺ Patienten; jedoch waren bei den beiden *AGAP4* und *CABP1* Genen nur die genetische Variante, die in der Gruppe der Mi-2⁺ Patienten vorkam, in der Bevölkerung selten beziehungsweise in genügender Kopienanzahl anzutreffen. Die Variante von *AGAP4* bei TIF-1 γ ⁺ Patienten hatte zu wenige Kopienanzahlen, die Variante von *CABP1* bei MDA5⁺ Patienten ist eine häufigere Variante, die in über 20 Carriern zu finden war. In der Gruppe der MDA5⁺ Patienten konnten wir keine spezifischen Genveränderungen feststellen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 22 zu finden. Für eine Auflistung der Gene mit NM-Nummer, Chromosomenposition, cDNA Position und Effekt der Mutation siehe Abschnitt 4.8., Seite 76.

Tabelle 22: DM spezifische und AK spezifische Gene bei Patienten mit DM

| DM spezifische Gene | AK spezifische Gene | | |
|---------------------|---------------------|----------------|-----------------------|
| | Mi-2 | TIF-1 γ | Mi-2 + TIF-1 γ |
| <i>ANKRD36</i> | <i>AGAP4</i> | <i>USF3</i> | <i>USP17L10</i> |
| <i>CNN2</i> | <i>CABP1</i> | / | / |
| <i>FRG1</i> | <i>MPRIP</i> | / | / |
| <i>MUC16</i> | <i>RAI1</i> | / | / |
| <i>PRSS3</i> | / | / | / |
| <i>RGPD8</i> | / | / | / |
| <i>ANP32B</i> | / | / | / |

Eine zweite Suche nach möglichen Genveränderungen wurde mithilfe der zusammengestellten Kandidatengenliste für den PD1 Signalweg durchgeführt; es wurden insgesamt 12 Mutationen entdeckt. In Tabelle 23 werden die Mutationen vor und nach der Kontrolle der Carrier und Kopienanzahl aufgeführt. Für eine Auflistung der Gene mit NM-Nummer, Chromosomenposition, cDNA Position und Effekt der Mutation siehe Abschnitt 4.8., Seite 76.

Tabelle 23: Veränderte Gene des PD1 Signalweges

| Autoantikörper | Vor Kontrolle | Nach Kontrolle (<20 Carrier, >50 Kopien) |
|---------------------------------|---|---|
| Mi-2 | Patient 1 / | / |
| | Patient 2 / | / |
| | Patient 3 / | / |
| | Patient 4 <i>PIK3C2G</i> | <i>PIK3C2G</i> |
| | Patient 5 <i>HRAS</i> | <i>HRAS</i> |
| TIF-1γ | Patient 6 / | / |
| | Patient 7 <i>B3GAT1, PIK3C2B, RASA1</i> | <i>B3GAT1</i> |
| | Patient 8 / | / |
| | Patient 9 / | / |
| MDA5 | Patient 10 <i>DHCR24, ITPR3</i> | / |
| | Patient 11 <i>DHCR24, ITPR3, PIK3C3</i> | <i>ITPR3, PIK3C3</i> |
| | Patient 12 <i>EOMES, VEGFB</i> | <i>EOMES</i> |

4.7. Interferon-Signatur

Die Analyse der WES Sequenzen zur Untersuchung der IFN-Signatur erfolgte mithilfe von einer zuvor erstellten Liste mit Kandidatengenen in Bezug auf die bekannte IFN-Signatur bei DM Patienten wie in 3.4.7 beschrieben unbiased und ohne Einschränkungen in Bezug auf Art der Vererbung oder Art der Mutation. Ausgeschlossen wurden Gene, die bei mehr als 20 Carriern vorkamen oder deren Kopienzahl <50 waren (siehe oben). Die Varianten der Patienten wurden abgeglichen.

Wie bereits im Abschnitt 1.2 dargelegt, existieren verschiedene Informationen, die die Vermutung nahelegen, dass in der Pathogenese der Dermatomyositis bestimmte

molekulare Wege /Signalwege involviert sind. So gibt es bereits viele Hinweise, dass Moleküle der sog. Interferon-Signatur dysreguliert sind und einen wesentlichen Beitrag zur Krankheitsentstehung bei DM liefern: so wissen wir bereits um eine distinkte IFN-Signatur bei DM Patienten und den verschiedenen Subgruppen (30, 31, 35, 37, 120). Die Tatsache, dass Proteine IFN-1-induzierbarer Gene, wie etwa *ISG15*, in Patienten mit DM verstärkt im Muskel exprimiert werden (36, 37) ist ebenso bekannt, wie die positive Korrelation der Expression von Typ 1 IFN-abhängigen Genen im Blut von Patienten mit der Krankheitsaktivität (40, 54). Im nächsten Schritt wollten wir daher prüfen, ob es genetische Veränderungen im Genom unserer Patienten gibt, die die Grundlage dieser speziellen IFN-Signatur bei Patienten mit DM bilden.

In Tabelle 24 werden alle im Zusammenhang mit der IFN-Signatur gefunden Mutationen vor und nach Überprüfung der Kopienanzahl und Carrier aufgeführt.

Tabelle 24: Veränderte Gene der Interferon-Signatur

| Autoantikörper | Vor Kontrolle | Nach Kontrolle (<20 Carrier, >50 Kopien) |
|---------------------------------|---|---|
| Mi-2 | Patient 1 <i>HLA-DRB1, STAT1, TLR4,</i> <i>TTN</i> | <i>HLA-DRB1, STAT1, TLR4,</i> <i>TTN</i> |
| | Patient 2 <i>MET</i> | / |
| | Patient 3 <i>HLA-DRB1</i> | <i>HLA-DRB1</i> |
| | Patient 4 <i>HLA-DRB1</i> | <i>HLA-DRB1</i> |
| | Patient 5 <i>IFIH1, MET, TLR4, TTN</i> | / |
| TIF-1γ | Patient 6 <i>HLA-B, IFI44L</i> | <i>IFI44L</i> |
| | Patient 7 <i>HLA-DRB1</i> | <i>HLA-DRB1</i> |
| | Patient 8 <i>HLA-A, IFIH1, JAK2, SYTL1,</i> <i>TTN</i> | <i>TTN</i> |
| | Patient 9 <i>HLA-DRB1, IFI16, TTN</i> | <i>HLA-DRB1</i> |
| MDA5 | Patient 10 <i>TTN</i> | / |
| | Patient 11 <i>HLA-A, HLA-DRB1, JADE2,</i> <i>MX1, TTN</i> | <i>HLA-DRB1</i> |
| | Patient 12 <i>HLA-B, HLA-DRB1, IFIH1,</i> <i>JAK2, MAPK14,</i> | <i>HLA-DRB1, JAK2</i> |

Wir konnten herausarbeiten, dass einige Gene, die zu der bereits beschriebenen IFN-Signatur gehören, in unserer Patientenkohorte verändert waren. Bei Kontrolle der

Kopienanzahl und Carrier stellte sich heraus, dass diese genetischen Varianten allerdings häufig in der Gesamtbevölkerung vertreten sind. Daher ist es unwahrscheinlich, dass diese die alleinige Ursache für das Auftreten einer seltenen Erkrankung, wie der DM, darstellen. Zu diesen Genen gehören *HLA-A*, *HLA-B*, *IFIH1*, *IFI16*, *JADE2*, *JAK2*, *MAPK14*, *MET*, *MX1* und *SYTL1*.

Gene, die für eine Erkrankung lediglich prädisponieren, ohne sie direkt auszulösen, sind in der Bevölkerung meist häufig vorhanden, führen aber nur durch- in vielen Fällen unbekannte- Triggerfaktoren dazu, dass Patienten im Verlauf ihres Lebens eine Erkrankung entwickeln.

Im folgenden Abschnitt sollen daher sowohl die Gene beschrieben werden, die als seltene genetischen Veränderungen direkten Einfluss auf die Pathogenese der DM haben könnten, als auch jene Gene, die in der Allgemeinbevölkerung häufig zu finden sind, und daher wahrscheinlich nur eine sekundäre Rolle für die Ätiologie bei DM spielen. Sieben Patienten (60%) wiesen eine genetische Variante *HLA-DRB1* im Humanen Leukozytenantigen (HLA)-Gen für MHC Klasse II auf, bei sechs Patienten (50%) war es die gleiche genetische Mutation.

Vor Kontrolle konnten bei sechs Patienten (50%) eine Veränderung im Gen *TTN* nachgewiesen werden, nach Kontrolle waren es nur noch zwei Patienten (15%). *TTN* kodiert das Protein Titin (das größte Protein des menschlichen Körpers), welches ein integraler Bestandteil des Sarkomerkomplexes in menschlichen Skelettmuskelzellen ist. In zwei Genen für MHC Klasse I (*HLA-A* und *HLA-B*) konnten ebenso genetische Veränderungen festgestellt werden; es waren drei Patienten betroffen, die jeweils entweder in *HLA-A* oder *HLA-B* Veränderungen zeigten.

Insgesamt fanden sich auch Mutationen in fünf bekannten INF1-induzierten Genen: *IFIH1* war bei drei Patienten verändert, *IFI16* war bei einem Patienten verändert, *MX1* war ebenfalls bei einem Patienten verändert, ebenso wie *IFI44L* und *SYTL1*. Das Gen für den Toll-Like-Rezeptor 4, *TLR4*, war bei zwei Patienten verändert. Im Gen für die Tyrosin-Protein Kinase *JAK2* war bei einem Patienten eine Mutation auffindbar. Im Gen *STAT1* war ebenso bei einem Patienten eine Mutation detektierbar. Das Protoonkogen *MET* war bei zwei Patienten verändert. Das Gen *JADE2* wies bei einem Patienten Mutationen auf. Bei einem Patienten konnte eine Mutation im Gen *MAPK14* festgestellt werden.

Dabei ist kein spezifischer Unterschied oder die Zugehörigkeit zu einer speziellen AK Subgruppe festzustellen. Für eine Auflistung der Gene mit NM-Nummer,

Chromosomenposition, cDNA Position und Effekt der Mutation siehe Abschnitt 4.8., Seite 76.

4.8. Charakterisierung der gefundenen Genveränderungen

In folgendem Abschnitt soll eine tabellarische Auflistung der entdeckten Genveränderungen mit NM-Nummer, Chromosomenposition, cDNA Position und Effekt der Mutation erfolgen.

Legende: Die Nomenklatur der Mutationen erfolgt anhand der Standards des Human Genome Variation Society (<http://www.HGVS.org/mutnomen/HUGO-MDI> initiative). c.= coding DNA; *= Stoppcodon, >= Substitution, del= Deletion, ins= Insertion, _= Range, fs= Frameshift, NMD/PTC= nonsense-mediated mRNA decay/ premature termination codons

Tabelle 25: Prädisponierende Gene der IFN-Signatur

| Genname | Genbank transcript ID | Chrom. Position | cDNA Position | Effekt der Mutation |
|--------------|----------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| <i>HLA-A</i> | NM_001242758, NM_002116 | 6:29910729insTCTGC | c.268_269insTCTGC | NMD/PTC, N90Ifs* |
| | NM_001242758, NM_002116 | 6:29911319Gdel | c.618delG | NMD/PTC, D207Tfs* |
| | NM_001242758, NM_002116 | 6:29911320G>T | c.619G>T | D207Y |
| <i>HLA-B</i> | NM_005514 | 6:31323958TTdel | c.604_605delAA | NMD/PTC, K202Afs* |
| | | 6:31323963insTT | c.600_601insAA | NMD/PTC, D201Kfs* |

| Genname | Genbank transcript ID | Chrom. Position | cDNA Position | Effekt der Mutation |
|---------------|--|-------------------------------|---|--------------------------------|
| <i>IFIH1</i> | NM_022168 | 2:163124024G>C | c.2863C>G | Q955E |
| | | 2:163124596C>T | c.2807+1G>A | splice site |
| <i>JADE2</i> | NM_015288 | 5:133895603C>T | c.395C>T | P132L |
| <i>JAK2</i> | NM_004972 | 9:5126343G>A | c.2741G>A, c.3188G>A | R914H, R1063H |
| <i>MAPK14</i> | NM_001315 | 6:36076169A>G | c.797A>G, c.1028A>G, | D266G, D343G |
| | NM_139014, NM_139012 | | | |
| <i>MET</i> | NM_001127500, NM_000245 | 7:116339642G>T | c.504G>T | E168D |
| | | 7:116411923C>T | c.2908C>T c.2962C>T | R970C R988C |
| <i>MX1</i> | NM_001144925, NM_002462, NM_001178046, | 21:42815731G>A | c.946G>A, c.877G>A | G316R, G293R |
| | | | | |
| <i>SYTL1</i> | NM_001193308, NM_032872 | 1:27676595insGCCGCCGCCGG C | c.879_880insGCCGCCG CCCGGC, c.843_844insGCCGCCG CCCGGC | NMD/PTC, S301Pfs*, S289Pfs* |

78 **Tabelle 26: Gene mit möglicher primärer Rolle in der Pathophysiologie der DM**

| Genname | Genbank transcript ID | Chrom. Position | cDNA Position | Effekt der Mutation |
|-----------------|------------------------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------|
| <i>HLA-DRB1</i> | NM_002124 | 6:32551961GC>CCGC | c.294_295delinsGCGG | NMD/PTC, Q99Rfs* |
| <i>IFI44L</i> | NM_006820 | 1:79093976C>T | c.376C>T | NMD/PTC, R126* |
| <i>JAK2</i> | NM_004972 | 9:5080656C>T | c.1960C>T, c.2407C>T | NMD/PTC, R654*, R803* |
| <i>STAT1</i> | NM_007315 | 2:191839588G>A | c.2206C>T | R736W |
| <i>TLR4</i> | NM_003266, NM_138554, NM_138557 | 9:120476185G>A | c.1659G>A, c.1779G>A | NMD/PTC, W553*, W593* |
| <i>TTN</i> | NM_001256850, NM_133378 | 2:179456968T>G | c.54740A>C, c.51959A>C | E18247A, E17320A, |
| | NM_001267550, NM_133432 | | c.59663A>C, c.32843A>C | E19888A, E10948A |
| | NM_003319, NM_133437 | | c.32468A>C, c.33044A>C | E10823A, E11015A |

Tabelle 27: DM spezifische Gene

| Genname | Genbank transcript ID | Chrom. Position | cDNA Position | Effekt der Mutation |
|----------------|-----------------------------|-----------------|---|-------------------------------|
| <i>ANKRD36</i> | NM_001164315 | 2:97851074Cdel | c.1961delC | NMD/PTC, S655Qfs* |
| | | 2:97851077C>G | c.1964C>G | NMD/PTC, S655* |
| | | 2:97851079insG | c.1965_1966insG | NMD/PTC, K656Efs* |
| <i>CNN2</i> | NM_201277, NM_004368 | 19:1037715T>C | c.809T>C, c.629T>C c.746T>C, c.713T>C | M270T, M210T, M249T, M238T |
| | NM_201277, NM_004368 | 19:1037716G>A | c.714G>A, c.810G>A, c.630G>A, c.747G>A | M238I, M270I, M210I, M249I |
| | NM_004368, NM_201277 | 19:1037718G>T | c.716G>T, c.749G>T, c.632G>T, c.812G>T | G239V, G250V, G211V, G271V |
| | NM_004368, NM_201277 | 19:1037756G>A | c.787G>A, c.670G>A, c.850G>A, c.754G>A | G263S, G224S, G284S, G252S |
| | NM_004368, NM_201277 | 19:1037766G>A | c.680G>A, c.797G>A, c.860G>A, c.764G>A | R227Q, R266Q, R287Q, R255Q |
| | NM_004368, NM_201277 | 19:1037781C>A | c.695C>A, c.812C>A, c.875C>A, c.779C>A | P232H, P271H, P292H, P260H |
| <i>FRG1</i> | NM_004477 | 4:190876307G>A | c.432+1G>A | splice site |

| Genname | Genbank transcript ID | Chrom. Position | cDNA Position | Effekt der Mutation |
|--------------|---|--|--|--|
| | | 4:190876272G>A 4:190876268A>G | c.398G>A c.394A>G | G133E I132V |
| <i>MUC16</i> | NM_024690 | 19:8999498insACCA 19:8999499CTTTdel | c.600_601insTGGT, c.40677_40678insTGGT c.596_599delAAAG, c.40673_40676delAAAG | P201Wfs*, NMD/PTC, P13560Wfs* NMD/PTC, K199Tfs*, K13558Tfs* |
| | NM_001197098, NM_002771, NM_001197097, NM_007343 | 9:33797929insCC | c.281_282insCC, c.302_303insCC, c.344_345insCC, c.473_474insCC | NMD/PTC, R94Sfs*, R101Sfs*, R115Sfs*, R158Sfs* |
| <i>PRSS3</i> | NM_002771, NM_001197098, NM_001197097, NM_007343 | 9:33797931ACdel | c.305_306delAC, c.347_348delAC, c.284_285delAC, c.476_477delAC | NMD/PTC, T103Sfs*, T117Sfs*, T96Sfs*, T160Sfs* |
| | NM_001197097, NM_007343, | 9:33797951A>C | c.367A>C, c.496A>C, c.325A>C, c.304A>C | M123L, M166L, M109L, M102L |

| Genname | Genbank transcript ID | Chrom. Position | cDNA Position | Effekt der Mutation |
|---------------|----------------------------|----------------------------------|------------------------|---------------------|
| | NM_002771, NM_001197098 | | | |
| <i>RGPD8</i> | NM_001164463 | 2:113147238A>G | c.2864T>C c.3284T>C | L955P L1095P |
| <i>ANP32B</i> | NM_006401 | 9:100777705G>A 9:100777710T>A | c.748G>A c.753T>A | D250N D251E |

88 Tabelle 28: AK spezifische Gene

| Genname | Genbank transcript ID | Chrom. Position | cDNA Position | Effekt der Mutation |
|-----------------|--|--|---|-----------------------|
| <i>AGAP4</i> | NM_133446 | 10:46321904C>T | c.1451G>A | R484H |
| <i>CABP1</i> | NM_004276 NM_031205, NM_001033677 | 12:121093630GTGCGTGTdel | c.17_24delGTGCGTGT c.46-4051_46-4044delGTGCGTGT c.46-266_46-259delGTGCGTGT c.655-4051_655-4044delGTGCGTGT, | NMD/PTC, A7Vfs* |
| <i>MPRIP</i> | NM_201274 NM_015134 | 17:17039562CAGCAG>CAG | c.534_539delinsCAG | S179- |
| <i>RAI1</i> | NM_030665 | 17:17697094CAGCAG>CAG 17:17697102GCAG>CAG | c.832_837delinsCAG c.840_843delinsCAG | Q278- Q280Hfs* |
| <i>USF3</i> | NM_001009899 | 3:113376111TGCTGCTGC>TGC TGC | c.4410_4418delinsGCAG CA | Q1462- |
| <i>USP17L10</i> | NM_001256852 | 4:9212403C>G 4:9213373C>T | c.21C>G c.991C>T | NMD/PTC, Y7* H331Y |

Tabelle 29: Gene des PD1 Signalweges

| Genname | Genbank transcript ID | Chrom. Position | cDNA Position | Effekt der Mutation |
|----------------|----------------------------|--------------------|---|----------------------------------|
| <i>B3GAT1</i> | NM_054025 | 11:134251843C>T | c.994G>A, c.1033G>A | V332M, V345M |
| <i>EOMES</i> | NM_005442, NM_0012781 | 3:27760347C>T | c.1196G>A, c.311G>A | R399Q, R104Q |
| <i>HRAS</i> | NM_005343, NM_001130442 | 11:532733G>A | c.473C>T | T158M |
| <i>ITPR3</i> | NM_002224 | 6:33660554T>C | c.7508T>C | I2503T |
| <i>PIK3C2G</i> | NM_004570 NM_001288772 | 12:18747475AGTTdel | c.3936_3939delAGTT, c.4059_4062delAGTT | NMD/PTC, V1313Kfs*, V1354Kfs* |
| <i>PIK3C3</i> | NM_002647 | 18:39542524A>G | c.328A>G, c.139A>G | I110V, I47V |

4.9. Ergebnisse der Literaturrecherche

Die Ergebnisse der Literaturrecherche werden im Folgenden kurz zusammengefasst. Die genaue Einordnung der erhaltenen Informationen und die bekannten Informationen zu den Genen erfolgt in der Diskussion.

Über eine Suche mit einer Liste an Kandidatengenen von Molekülen, die Teil des PD1 Signalweges sind, konnten bei unserer Patientenkohorte sechs veränderte Gene gefunden werden: *PIK3C2G* und *PIK3C3*, *HRAS*, *ITPR3*, *EOMES* und *B3GAT1*. Auf die möglichen Auswirkungen der Mutationen in diesen Genen soll im Folgenden eingegangen werden (siehe Tabelle 23).

Jene Gene, die in unserer untersuchten Kohorte bei mindestens 11 Patienten vorkamen, titulierten wir als DM spezifische Gene. Unter die DM spezifischen Gene fielen: *ANKRD36*, *CNN2*, *FRG1*, *MUC16*, *PRSS3*, *RGPD8* und *ANP32B* (siehe Tabelle 22). Während unter die AK spezifischen Gene: *AGAP4*, *MPRIP*, *RAI1* und *CABP1* für die Mi-2 AK positiven Patienten, und *USF3* für Patienten mit TIF-1 γ AK fielen. Für die Gruppe der Patienten mit dem AK MDA5 konnten keine spezifischen Gene gefunden werden. Dafür gibt es eine weitere Veränderung im Gen für *USP17L10*, welche nur in den beiden AK Gruppen von Mi-2 und TIF-1 γ detektierbar war (siehe Tabelle 22).

Als potenziell prädisponierende Gene der IFN-Signatur bei Patienten mit DM konnten *HLA-A*, *HLA-B*, *IFIH1*, *IFI16*, *JADE2*, *JAK2*, *MAPK14*, *MET*, *MX1* und *SYTL1* identifiziert werden. Aufgrund der Zusammengehörigkeit wird die Bedeutung der *HLA-A* und *HLAB* Mutationen im Abschnitt mit *HLA-DRB1* besprochen (siehe Tabelle 24).

Des Weiteren konnten folgende Gene der IFN-Signatur mit primärerer Rolle in der Krankheitsentstehung bei Patienten mit DM identifiziert werden: *HLA-DRB1*, *IFI44L*, *JAK2*, *STAT1*, *TTN* und *TLR4* (siehe Tabelle 24).

4.10. Abschließender Überblick der Ergebnisse

Durch eingehende Analyse der WES Daten konnten wir eine Reihe von genetischen Veränderungen bei Patienten mit DM finden. Es wurden zwei unabhängige Suchstrategien verwendet, die ergaben, dass sowohl Gene von Molekülen verändert waren, die im Zusammenhang mit dem PD1 Signalweg stehen, als auch Moleküle, die den IFN Signalweg beeinflussen können. Auf der Suche nach Genen, welche die Interferon-Hypothese bei der Krankheitsentstehung untermauern könnten, fanden wir Gene, die selten vorkamen, was dafür sprechen kann, dass sie die Ursache einer so seltenen Erkrankung wie der DM sein könnten, aber auch Gene, die in der Bevölkerung häufig vorzufinden waren und dadurch eine Prädisposition für DM darstellen könnten.

Die Literatursuche ergab, dass die Proteine der veränderten Gene wichtig für eine Reihe von Zellfunktionen sind. Die Regulierung der Zellproliferation, des Zellwachstums und der Apoptose sowie die Modulierung von Immunantworten und der Aufbau des Zytoskelettes waren nur einige davon. In den untenstehenden Tabellen werden die verschiedenen Funktionen der einzelnen Gene sowie mögliche Interaktionspartner und assoziierte Erkrankungen kurz zusammengefasst (siehe Tabelle 30, Tabelle 31, Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34). Interessanterweise fand sich bei vielen Genen ein Zusammenhang mit dem PI3K/AKT-Signalweg, daher wird dieser Punkt in der Diskussion (siehe Abschnitt 5.2.2, Seite 107 und Abschnitt 5.4, Seite 124) eingehend diskutiert.

Tabelle 30: Prädisponierende Gene der Interferon-Signatur

| Gen | Funktion | Interaktion | assoziierte Erkrankungen |
|---------------|---|--|---|
| <i>HLA-A</i> | Teil des MHC-1 Komplex, Antigenpräsentation gegenüber Immunzellen | Initiierung von Immunreaktionen | / |
| <i>HLA-B</i> | Teil des MHC-1 Komplex, Antigenpräsentation gegenüber Immunzellen | Initiierung von Immunreaktionen | / |
| <i>IFIH1</i> | alias Anti-Melanoma Differentiation-associated Gene 5 (MDA5); nukleare RNA-Helikase | ISG | DM |
| <i>JADE2</i> | Mitglied der JADE Familie | Histonacetyltransferase | Ovarzell-Karzinom, Alopezie |
| <i>JAK2</i> | Teil des adaptiven und angeborenen Immunsystems, Regulation der Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Immunregulation | JAK/STAT Signalweg, Aktivierung über unterschiedliche Moleküle wie IFN- γ , TNF- α , IL-5, IL-6, IL-10 | DM, Polymyositis, SLE, essentielle Thrombozytose, Polycythämia vera |
| <i>MAPK14</i> | auch p38 α , Apoptose, Zellwachstum, Immunantworten und der Antwort auf DNA-Schaden, Produktion inflammatorischer Mediatoren | MAPK-Signalweg, Aktivierung durch VEGF, oxidativen Stress, UV-Strahlung | Colitis Ulcerosa, Morbus Crohn, Prostata-Karzinom, Magen-Karzinom, Kolon-Karzinom |
| <i>MET</i> | Protoonkogen, Embryogenese, Wundheilung, Leberregeneration, Angiogenese und Immunmodulation | MAPK-Signalweg, PI3K/AKT Signalweg | NSCLC, Kolon-Karzinom oder Schilddrüsen-Karzinom, Mamma-Karzinom, Polycythämia Vera, RA |

| Gen | Funktion | Interaktion | assoziierte Erkrankungen |
|--------------|--|--|---------------------------------|
| <i>MX1</i> | ISG | Interferonantwort | DM |
| <i>SYTL1</i> | Vesikeltransport, Exozytose von Granula in Neuronen, Koordinierung der Chemotaxis und Migration von Neutrophilen | Rab, Teil der RAS Familie, RAP1GAP2, AKT | / |

Tabelle 31: Gene mit möglicher primärer Rolle in der Pathophysiologie der DM

| Gen | Funktion | Interaktion | assoziierte Erkrankungen |
|-----------------|---|--|---|
| <i>HLA-DRB1</i> | Teil des MHC-2 Komplex, Antigenpräsentation, Phagozytose, Endozytose | Initiierung von Immunreaktionen | IIM, DM, RA |
| <i>IFI44L</i> | Gehört zur Gruppe der ISG | Expression durch Viren wie Influenza A oder RSV beeinflusst, nach Bindung an FKBP5 negative Regulierung der Interferon Antwort | DM, SLE |
| <i>JAK2</i> | Teil des adaptiven und angeborenen Immunsystems, Regulation der Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Immunregulation | JAK/STAT Signalweg, Aktivierung über unterschiedliche Moleküle wie IFN- γ , TNF- α , IL-5, IL-6, IL-10 | DM, Polymyositis, SLE, essentielle Thrombozytose, Polycythämia vera |
| <i>STAT1</i> | Teil des adaptiven und angeborenen Immunsystems, Regulation der Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Immunregulation, Aktivierung von T-Helferzellen | JAK/STAT Signalweg, Aktivierung durch IFN- γ | SLE, DM |
| <i>TLR4</i> | T-Zell-Rezeptor, führt zur Expression von Zytokinen und Chemokinen, Immunzellreifung, sterile Inflammation | TLR Signalweg | DM |
| <i>TTN</i> | Myofilament, Teil des Sarkomerkomplexes Kraftgenerierung | Z-Scheibe und M-Banden | kardiale und neuromuskuläre Erkrankungen, wie DCM |

Tabelle 32: DM spezifische Gene

| Gen | Funktion | Interaktion | assoziierte Erkrankungen |
|----------------|--|---|---|
| <i>ANKRD36</i> | / | / | / |
| <i>CNN2</i> | Aktin Filament-assoziiertes regulatorisches Protein, Makrophagen-Adhäsion | stabilisieren durch Inhibierung der Aktin-aktivierten Myosin ATPase das Aktin-Zytoskelett | SLE, RA, Sjögren Syndrom |
| <i>FRG1</i> | Teil des Splicesomes, Funktion in der Muskelentwicklung, Stabilisierung der F-Aktin Polymerisation | reguliert mRNA Biosynthese von Genen, die für Muskelentwicklung wichtig | FSHD |
| <i>MUC16</i> | an Ausbildung der Glykokalix beteiligt, alias CA125, mütterliche Toleranz gegenüber fetalem Gewebe | Galectin-1 und Galectin-3 | Ovarial-Karzinom, Pankreas-Karzinom, Mamma-Karzinom, Bronchial-Karzinom |
| <i>PRSS3</i> | Trypsinogen, Proteolyse, Zellmigration und angiogenetischer Stimulation assoziiert, Desquamation | TFPI-2 | Epitheliale Tumore, Diabetes Mellitus Typ2 |
| <i>RGPD8</i> | / | / | / |
| <i>ANP32B</i> | Kofaktor der viralen Influenzapolymerase, übernimmt im Mausmodell eine immunmodulatorische Rolle, Regulierung der Transkription bestimmter Gene aufgrund von Histon-Chaperon Aktivität, und Zellzyklusprogression von G1 zur S-Phase | Caspase-3-abhängigen Apoptose, ANP32B-Defizienz reguliert die Phosphorylierung von AKT | Mamma-Karzinom |

Tabelle 33: AK spezifische Gene

| Gen | Funktion | Interaktion | assoziierte Erkrankungen |
|-----------------|--|-------------------------------|---|
| <i>AGAP4</i> | Assoziation zu Strahlenexposition, Paralog AGAP2 gehört zu PIKE Familie, die in PI3/AKT Signalweg beteiligt | / | / |
| <i>CABP1</i> | | | |
| <i>MPRIIP</i> | In vaskulären glatten Muskelzellen wesentlich an Regulierung der Kontraktion und Dilatation dieser Zellen beteiligt | MLCP, Aktinomyosin, RhoA, MBU | Bronchial-Karzinom, Eosinophilen-assoziierten myeloproliferativen Neoplasie |
| <i>RAI1</i> | Transkriptionsfaktor in die Regulation der Zellproliferation und des Zellzyklus involviert ist und für die Knochen- und Skelettentwicklung, Lipid- und Glukosemetabolismus, embryonale Gehirnentwicklung, neuronale Funktion sowie letztendlich auch die Verhaltensbildung | / | Smith Magenrisyndrom |
| <i>USF3</i> | alias KIAA2018, Knochendichte, mentale Entwicklung | MAPK-Signalweg, AKT | Cowden Syndrom, Autismus Spektrumstörungen, Childhood Disintegrative Disorder |
| <i>USP17L10</i> | Mitglied der Deubiquitinasen-Familie, vermutliche onkogene Wirkung | ERK-Signalweg, ELK-1 | NSCLC, Mamma-Karzinom |

Tabelle 34: Gene des PD1 Signalweges

| Gen | Funktion | Interaktion | assoziierte Erkrankungen |
|----------------|---|--|--|
| <i>B3GAT1</i> | Biosynthese von Human natural killer-1 (HNK-1) alias CD57 | Marker für T-Zell-Seneszenz | Morbus Basedow, ankyloisierende Spondylitis, RA, DM, Polymyositis, IBM |
| <i>EOMES</i> | Marker für T-Zell-Ermüdung | unregulierte Expression kann zu verminderter Toleranz und Autoimmunität | RA, Psoriasis, SLE, IMM |
| <i>HRAS</i> | Familie der RAS GTPasen | beteiligt in Signalwegen wie Raf/MEK/ERK MAPK, PI3K/AKT, Ral-GEFs und Phospholipase C ϵ | CRC, Bronchial-Karzinom, Pankreas-Karzinom |
| <i>ITPR3</i> | intrazellulärer Ca^{2+} Kanal, Sekretion, Proliferation, Metabolismus der Mitochondrien und Apoptose, B-Zell-Reifung und B-Zell - Aktivierung | Ca^{2+} Depletion aus dem Endoplasmatischem Retikulum | SLE, Sjögren Syndrom, Kawasaki-Syndrom |
| <i>PIK3C2G</i> | Lipidkinase, Teil des PI3K/AKT Signalweges, Zellwachstums, -metabolismus und -migration; Mitophagie | AKT | CRC, RA, Psoriasis |
| <i>PIK3C3</i> | Lipidkinase, Teil des PI3K/AKT Signalweges, Zellwachstums, -metabolismus und -migration, Mitophagie | AKT | CRC, RA, Psoriasis |

5. Diskussion

Auch wenn Muskelerkrankungen insgesamt - und Dermatomyositis im speziellen - in der Allgemeinbevölkerung sehr selten vorkommen, so stellen sie doch für jeden einzelnen Patienten, der an ihr erkrankt, einen großen Einschnitt im Leben dar. Die Ätiologie und Pathophysiologie, welche der DM zugrunde liegen, sind allerdings bisher nur teilweise verstanden.

Die DM vereint in sich verschiedene Antikörper-abhängige Subgruppen, die jede für sich mit unterschiedlichen Symptomen, Prognose und Therapierelevanz der Erkrankung vergesellschaftet sind. Mi-2⁺ Patienten zum Beispiel zeigen häufiger eine stärker ausgeprägte Muskelschwäche als MDA5⁺ Patienten, bei welchen vor allem extramuskuläre Symptome im Vordergrund stehen (14, 23, 30, 121). MDA5⁺ Patienten besitzen ein wesentlich höheres Risiko für die Entwicklung einer rapid verlaufenden ILD, die in bis zu 80% der Fälle trotz früher Diagnose und intensiver immunsuppressiver Behandlung letal enden kann (etwa 30%) (122). TIF-1 γ ⁺ Patienten (>40 Jahre) wiederum haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Neoplasien (19, 21, 29). Die korrekte Diagnostik, Behandlung und Risikostratifizierung sind deshalb umso wichtiger und bedeuten eine große Herausforderung im klinischen Alltag. Bis heute gibt es keine randomisierten kontrollierten Studien zur Therapie für Patienten mit idiopathischen inflammatorischen Myopathien, die die Erkrankung kausal bekämpfen, so dass heutige Empfehlungen auf dem Evidenzniveau „Expertenmeinung“ rangieren. Häufig verabreichte Medikamente umfassen zum Beispiel systemische Glukokortikoide, Immunglobuline, Rituximab, Calcineurin-Inhibitoren, Methotrexat, Azathioprin oder Cyclophosphamid und ähnliche (123, 124). Diese zählen zur Gruppe der Immunsuppressiva oder Immunmodulatoren und bergen eine Vielzahl an möglichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen in sich, die das Leben von Patienten, zusätzlich zu der zugrundeliegenden Erkrankung, erheblich erschweren können. Andererseits gibt es noch eine signifikante Anzahl von Patienten, bei adulter DM circa 30%, die als Nonresponder gar nicht von der Therapie mit Immunsuppressiva profitieren, was die Chancen auf eine erfolgreiche Behandlung zusätzlich schmälert (125). Ein besseres Verständnis der Pathogenese im Fall der DM würde somit wesentlich dazu beitragen, die möglichen Therapien und somit auch die Lebensqualität von Patienten zu verbessern oder gar zu spezifizieren.

Obwohl die Ätiologie vieler Autoimmunerkrankungen, zu denen die DM grundsätzlich auch gezählt wird, bisher größtenteils ungeklärt ist, werden genetische und mikrobielle, ebenso wie Umweltfaktoren als wichtige Bestandteile der Krankheitsentstehung vermutet. Assoziationen zwischen genetischen Varianten und einem pathogenen Phänotyp können beobachtet werden, jedoch hat sich auch gezeigt, dass nicht alle Träger einer Mutation automatisch eine Erkrankung entwickeln. Derzeit wird angenommen, dass bei einem prädisponierten Individuum mikrobielle, hormonelle oder gar psychologische Trigger den Verlust der immunologischen Toleranz gegenüber Autoantigenen induzieren und in einer immunologischen Antwort mit Gewebsdestruktion resultieren.(126)

Diese Pathogenese wird beispielsweise für SLE angenommen: DNA Microarray Genexpressionsstudien konnten Gensignaturen von SLE identifizieren (127-131). In weiterer Folge konnten sogar distinkte Gruppen von Genen ausgemacht werden, die für unterschiedliche Aspekte der Erkrankung wichtig sind: so gibt es eine „susceptibility signature“, eine „activity signature“ und eine „severity signature“ (132). Ein vergleichbares Modell wäre für DM gut vorstellbar.

Vor diesem Hintergrund untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von PD1 und seinen beiden Liganden bei Patienten mit DM und versuchten genetische Veränderungen im Genom von Patienten, sowohl in Genen des PD1 Signalweges als auch in Genen der sogenannten IFN-Signatur, ausfindig zu machen. Es wurde eine Vielzahl von Färbungen durchgeführt, um zu zeigen, dass die ausgewählten DM Patienten die schon vorbeschriebenen und bekannten Eigenschaften der jeweiligen Subgruppe aufwiesen und daher eine repräsentative Gruppe darstellten (siehe 4.3). Auch die erhobenen klinischen Daten zeigten, dass die Patienten die jeweils klassischen Attribute der jeweiligen AK Subgruppe besaßen. Die gewählten Patienten bildeten somit eine aussagekräftige Kohorte.

Dadurch war die Grundlage geschaffen, sich den in Abschnitt 1.2 dargelegten Hypothesen zur Pathogenese der DM zuzuwenden: der Interferon-Hypothese und der Immuncheckpoint-Hypothese. Die Interferon-Hypothese beschäftigt sich mit der sogenannten Interferon-Signatur und postuliert einen ätiopathogenetischen Zusammenhang zur DM mit einer fehlgerichteten Interferon Antwort in Analogie zu anderen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem SLE. Meine Hypothese, die in dieser Arbeit untersucht werden sollte, baut hierauf auf und stellt die Frage nach einer möglichen

genetischen Ursache für diese pathologische Interferon-Signatur. Die Immuncheckpoint-Hypothese beschreibt einen dysregulierten Signalweg des inhibitorischen Immunregulators PD1 als Ursache von exzessiven immunologischen Reaktionen gegen Autoantigene. Auch hier haben wir die Hypothese aufgestellt, dass dem eine oder mehrere genetisch basierte Veränderungen zugrunde liegen könnten.

Die Skelettmuskelbiospien aller Patienten zeigten das Vorhandensein von PD1 und seinen beiden Liganden PD-L1 und PD-L2 (siehe 4.4). Die spezifische Lokalisation von PD1 auf CD3⁺, CD20⁺ und CD68⁺ Zellen, PD-L1 auf CD4⁺ und CD68⁺ Zellen und PD-L2 auf CD20⁺ Zellen konnte illustriert werden. Dies bestätigt, dass diese Moleküle maßgeblich an der Orchestrierung der Immunreaktion bei DM *in situ* beteiligt sind. Die Expression der Moleküle wurde auf genetischem Level im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Moleküle des PD1 Signalweges bei Patienten mit DM in verschiedenen Antikörpergruppen unterschiedlich exprimiert werden. Mit den DNA-Proben ausgewählter Patienten wurde eine Whole Exome Sequenzierung durchgeführt. Die Daten der WES Analyse wurden auf zwei Arten untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Patienten mit DM verschiedene Veränderungen sowohl in Genen des PD1 Signalweges und in Genen der Interferon-Signatur aufweisen als auch in Genen, welche DM oder Antikörper spezifisch waren. Die inhaltliche Relevanz der erhaltenen Gene wurden durch eingehende Literaturrecherche evaluiert. Der Zusammenhang der Gene mit unterschiedlichen Krankheitsaspekten von DM wurde analysiert. Die biomedizinische Relevanz wurde per Genecards, HUGO und STRING untersucht und wird weiter unten detailliert diskutiert (siehe ab Abschnitt 5.1, Seite 95)

5.1. Dermatomyositis Signaturen: DM spezifische und AK spezifische Gene

5.1.1. DM spezifische Gene

Jene Gene, die in unserer untersuchten Kohorte bei mindestens 11 Patienten vorkamen, titulierten wir als DM spezifische Gene. Unter die DM spezifischen Gene fielen: *ANKRD36*, *CNN2*, *FRG1*, *MUC16*, *PRSS3*, *RGPD8* und *ANP32B* (siehe Tabelle 22). Da diese Gene in all unseren Patienten, unabhängig vom AK Status zu finden waren, während es in der gesunden Normalbevölkerung kein Vorliegen von Mutationen in diesen Genen gab, können wir davon ausgehen, dass es sich zumindest um für die DM prädisponierende Genalterationen handeln könnte.

Eine Interpretation oder Spekulation über die Auswirkungen ist jedoch nicht immer fundiert möglich, da teilweise nicht genügend Informationen über die gefundenen Gene und ihre Funktion vorliegen. So ist zum Beispiel auf Grundlage dessen, dass weitgehend unbekannt ist, ob *ANKRD36* nun zu den MARP, den „muscle ankyrin repeat proteins“, zählt und eine ähnliche Funktion in Muskelzellen erfüllt wie diese, eine Interpretation des Zusammenhangs zwischen der *ANKRD36* Mutation der Patienten mit der Pathophysiologie der DM aktuell nicht möglich. Dafür sind die anderen Gene in einem klaren Zusammenhang zu sehen, da mehr über ihre biologische Relevanz oder Beteiligung in Erkrankungen bekannt ist.

ANKRD36 wird auch Ankyrin Repeat Domain-Containing Protein 36 genannt. Zu diesem Gen konnten keine reichhaltigen Informationen gefunden werden. *ANKRD2* ist ein Protein, das wie *ANKRD36* durch eine Ankyrin Repeat Domain, einem in Proteinen mit unterschiedlichsten Funktionen häufig vorkommenden Motiv, gekennzeichnet wird. Proteine mit Ankyrin Repeats sind vor allem für Systeme mit intensiver Interaktion und Kommunikation von starker Bedeutung. (133, 134) *ANKRD2* gehört zu der Gruppe der Muskel Ankyrin Repeat Proteine (muscle ankyrin repeat proteins, MARP), die in einen Mechanosignalweg involviert sind, der die myofibrilläre Stressantwort mit der Muskelgenexpression verbindet. Abgesehen davon erfüllen diese noch eine wichtige Rolle in der transkriptionalen Regulation, Myo- und Kardiogenese und Myofibrillen-Ansammlung (134). Alle MARPs besitzen die Fähigkeit mit Titin zu interagieren (133, 135). Insgesamt ist es also auch nicht verwunderlich, dass genetische Veränderungen

von ANKRD2 bei Muskeldystrophien und kongenitale Myopathien gefunden werden konnten (136, 137).

Die Familie der Calponin (CNN) Proteine CNN1, CNN2 und CNN3 wird in glatten Muskelzellen und einer Reihe weiterer nicht-muskulärer Zellen exprimiert und bildet eine Gruppe von Aktin Filament-assoziierten regulatorischen Proteinen (138). Alle drei Calponin-Isoformen fungieren als Aktin-bindende Proteine, die durch Inhibierung der Aktin-aktivierten Myosin ATPase das Aktin-Zytoskelett stabilisieren (139-141). Dabei unterscheiden sich die genannten Isoformen jeweils in ihren Lokalisationen: CNN2 lässt sich außer in glatten Muskelzellen (142) in einer Vielzahl von anderen Zellen nachweisen, so zum Beispiel epidermalen Keratinozyten (143), Endothelzellen (144), Fibroblasten (145) und myeloischen Zellen (146): Zellen, die unter physiologischen Bedingungen unter großem mechanischen Einfluss stehen. Eine große Anzahl von Zellfunktionen, die durch CNN2 reguliert werden, konnten bis dato identifiziert werden: es unterstützt die Zellproliferationsrate, reguliert die Zellmotilität durch die Inhibierung Aktin aktivierter Myosin Motorfunktionen und hat Einfluss auf die Zellmigration (138). Zusätzlich übernimmt CNN2 auch eine wichtige Rolle für die Funktion von Immunzellen: CNN2 ist ein inhibitorischer Regulator der Makrophagenmigration und der Phagozytose (147).

Eine Studie fand passend dazu heraus, dass es bei Patienten mit RA zu einer Hochregulierung von CNN2 auf Makrophagen, sowohl in der Synovialflüssigkeit, als auch auf Monozyten im Blut, kommt; die gleiche Studie konnte zeigen, welche Verbindungen zwischen einer Deletion im Gen *CNN2* und dem Krankheitsmechanismus der RA bestehen könnten: durch *CNN2* knockout bei Mäusen kommt es zu einer geringeren Osteoklastenaktivität sowie einer Inhibierung der Osteoklastengnese und somit zu einem geringeren Knochenabbau. Außerdem weisen Makrophagen von *CNN2* knockout Mäusen eine erhöhte Zellmigration und Phagozytoseaktivität auf, was über eine Entfernung der Autoimmunkomplexe zur Beendigung einer inflammatorischen Reaktion beitragen könnte. Auch die Abhängigkeit der Makrophagen-Adhäsion von CNN2 konnte gezeigt werden. (148)

Die Zelladhäsion stellt einen wichtigen Schritt für die Differenzierung und Aktivierung von Makrophagen dar (149). Kompromittierte Phagozytose durch Makrophagen wurde mit der Pathogenese von SLE (150) und RA (151, 152) in Verbindung gebracht. Zusammenfassend ergab sich also, dass die Expression von CNN2 die Vorgänge, die

zur Ausbildung der bei RA bekannten Symptome führen, unterstütze und dass durch knockout von *CNN2* die Schwere der Inflammation abgeschwächt werden konnte (148). Auf der Suche nach Zusammenhängen mit anderen Autoimmunerkrankungen zeigte sich, dass bei Patienten mit Sjögren Syndrom Calponin 3 ein Autoantigen darstellt und Antikörper gegen diese Isoform bei erkrankten Patienten nachgewiesen werden konnten (153).

Ein Zusammenhang einer Mutation im Gen *CNN2* mit der Pathogenese der DM scheint zum Beispiel nach derzeitigen Forschungsstand möglich. Dass Veränderungen in Genen von Zytoskelettbestandteilen zur Entstehung von Muskelerkrankungen führen, ist weithin bekannt. Im Falle des *CNN2* würde die Ätiologie allerdings- den derzeitigen Daten zufolge- vermutlich über eine gestörte Makrophagenfunktion mit veränderter Phagozytoseaktivität bei der DM durchaus relevant sein können: in Skelettmuskelbiopsaten von DM Patienten können eine Vielzahl von Makrophagen gefunden werden (154). Diese präsentieren als APC Autoantigene an B-Zellen und T-Zellen und können über diesen Mechanismus wesentlich an autodestruktiven Gewebszerstörungen beteiligt sein. Makrophagen stellen bei allen AK-basierten DM Subgruppen die dominante Zellpopulation im Gewebe dar. Warum die gleiche Mutation nicht die gleichen morphologischen Eigenschaften als Folge hervorruft, sondern im Gegenteil die Antikörpersubgruppen hoch spezifische Unterschiede in der Dichte und Verteilung der Makrophagen aufweisen kann noch nicht beantwortet werden.

Das Protein, welches durch das Gen *FRG1* kodiert wird, stellt ein hochkonserviertes Gen in Vertebraten und Nichtvertebraten dar (155). *FRG1* wird als das führende Kandidatengen für Facioscapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD) gesehen: bei FSHD handelt es sich um eine autosomal-dominante Myopathie, die durch eine progressive Atrophie der Gesichts-, Oberarm- und Schultermuskulatur gekennzeichnet ist (156). Aufgrund seiner Lokalisation im Nukleus wird angenommen, dass *FRG1* eine Rolle für die RNA Biosynthese spielt; es konnte als Teil des Spliceosomes identifiziert werden (157, 158). Die Überproduktion des *FRG1* Proteins in Muskelzellen dürfte die führende Ursache sein, die zur Krankheitsentstehung von FSHD führt (159), obwohl auch eine gestörte Muskelentwicklung möglich sein könnte, wie dies neuere Daten suggerieren, die *FRG1* eine grundlegende Funktion in der Muskelentwicklung zuschreiben (156). *FRG1* reguliert die mRNA Biosynthese von jenen Genen, die ihrerseits wieder für die Regulierung der Muskelzellentwicklung zuständig sind; andererseits unterstützt *FRG1*

durch Stabilisierung der F-Aktin Polymerisation die Muskelzellfunktion (156, 159-165). Passend dazu konnte auch gezeigt werden, dass erhöhte Werte von FRG1 die Entwicklung von Skelettmuskelzellen beeinträchtigt (156).

Die Funktion des Gens *FRG1* ist offenbar noch nicht vollständig verstanden- man geht jedoch davon aus, dass dieses Gen eine Rolle in der Regulation des pre-mRNA „splicings“ spielt und an dem Zusammenführen von rRNA in Ribosomen. Auf dieser subzellulären Ebene ist gut denkbar, dass das gebildete Protein eine wichtige Rolle bei der Differenzierung zum Beispiel im deutlich gesteigerten Regenerationsprozess spielt. Allerdings kann zu diesem Zeitpunkt kein Zusammenhang mit der Pathogenese der DM hergestellt werden.

Mucin 16 (MUC16) ist ein Oberflächenprotein auf verschiedenen Epithelien, das, durch Ausbildung einer Glykokalix, an dem Aufbau einer Barriere als Schutz gegenüber externen Schädigungen beteiligt ist (166-170). Diese Barrierefunktion wird zusätzlich durch die Interaktion von MUC16 und Lektinen, wie Galectin-1 und Galectin-3, unterstützt (171-173). Auch unter dem Namen CA125 bekannt, wird MUC16 unter anderem als Biomarker für das Ovarial-Karzinom benutzt (166). Eine Überexpression von MUC16 wurde auch in anderen Tumorentitäten, wie Pankreas-Karzinom, Bronchial-Karzinom und Mamma-Karzinom nachgewiesen (174-176). MUC16 Expression ist häufig mit einer erhöhten Proliferationsrate und Metastase-Wahrscheinlichkeit verknüpft und eine Überexpression ist mit einer schlechten Prognose in einigen Tumorentitäten assoziiert (166). MUC16, das im weiblichen Reproduktionstrakt exprimiert wird, leitet durch Bindung an Immunzellen, wie NK Zellen und Monozyten, über Siglec-9, einem inhibitorischen Oberflächenrezeptor, die mütterliche Toleranz gegenüber fetalem Gewebe ein (177). Zufällig konnte kürzlich gezeigt werden, dass in Geweben, die für die Pathogenese der Psoriasis wesentlich sind - wie Haut und Thymus - MUC16 exprimiert wird und sogar auf suprabasalen Epidermiszellen angefärbt werden kann; Zellen, die als Bestandteil der hyperkerativen Zone bei Patienten mit Psoriasis wesentlich für die Pathophysiologie dieser Erkrankung sind (178). Ein anderes Mitglied der Mucin Familie, MUC19, konnte außerdem mit der Pathogenese des Morbus Crohn in Verbindung gebracht werden (179). Eine Mutation im Gen *MUC16* könnte wie folgt zur Pathophysiologie der DM beitragen: wenn MUC16 physiologischer Weise im Muskel eine ähnliche Rolle hätte wie im weiblichen Reproduktionstrakt und es durch die bei unseren Patienten entdeckten Mutationen zu einem Verlust dieser induzierten Toleranz durch MUC16 kommt, könnten

autoimmune Reaktionen die Folge sein. Diese Theorie müsste in Zukunft allerdings noch untersucht werden. Eine anderer möglicher Zusammenhang betrifft den MAPK-Signalweg: Es konnte gezeigt werden, dass MUC16 an Mesothelin, ein Protein des Mesothels, binden kann und dass diese Interaktion zur Bildung von Metastasen im Peritonealraum bei Pankreas- und Ovarial-Karzinom beiträgt, weil Krebszellen sich dort dadurch dann leichter an das Mesothel anheften können (180-182).

MUC16 ist als ein bekannter Marker von Tumorprogression ein besonders spannender Kandidat für die Pathogenese der DM, vor allem vor dem Hintergrund der Assoziation von DM mit Malignomen. Das gebildete Protein ist ein negativer Regulator der Epithelproliferation, der Interleukin-6 Biosynthese und der Wundheilung. Es wird vermutet, dass der Mechanismus der Metastasenbildung von Ovarial- und Pankreas-Karzinom durch MUC16 über eine erhöhte Phosphorylierung- und damit die Aktivierung von p38 (MAPK14) reguliert wird (166). Dies ist spannend vor dem Hintergrund, dass wir bei unserer Patientenkohorte sowohl eine Mutation gefunden haben, die *MAPK14* direkt betrifft sowie Mutationen in Genen, die diesen Signalweg ebenso beeinflussen. Proteine der Gene *MET*, *USF3*, *HRAS* und *TLR4* interagieren direkt mit dem MAPK-Signalweg, *ANP32B*, *PIK3C2G*, *PIK3C3* und *SYTL1* interagieren via dem AKT-Signalweg mit dem MAPK-Signalweg (siehe Abschnitt 4.10, Seite 85).

Die Serin Protease 3 (PRSS3) stellt eine Isoform von Trypsinogen dar und übernimmt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Progression verschiedener maligner Erkrankungen (183-185). Vor allem die Tumorprogression epithelialer Tumore, wie Bronchial- (186), Mamma- (187), Ovarial- (188), Ösophagus- (189), Pankreas- (184) und Prostata-Karzinom (185) ist mit einer Hochregulierung von PRSS3 assoziiert. Bei Patienten mit Mamma-Karzinom korreliert das Expressionslevel der mRNA und des Proteins unter anderem mit der 5-Jahres-Überlebensrate und kann daher als prognostischer Marker verwendet werden (190). Physiologisch erfüllen Trypsine eine wichtige Rolle: sie sind eine Gruppe von Serinproteasen, die in Form von Zymogenen durch das Pankreas produziert und ins Duodenum sezerniert werden, wo sie nach Aktivierung durch Enteropeptidasen als Verdauungsenzyme fungieren (191). Aufgrund der proteolytischen Aktivität von Trypsinen ist deren Regulierung einer strengen Balance unterworfen, welche unter anderem durch Proteaseninhibitoren reguliert wird (192). Störungen dieses fragilen Systems sind für pathologische Veränderungen in einer Reihe von Erkrankungen verantwortlich wie Krebs, cystische Fibrose, chronisch-obstruktive

Lungenerkrankung, Akutes Respiratorisches Distress Syndrom, Asthma, Zirrhose, Thrombose, Demenz, Pankreatitis und Psoriasis (193-198). Aufgrund seiner Resistenz gegenüber Proteaseinhibitoren wird angenommen, dass PRSS3 eine distinkte Funktion zukommt, nämlich die Proteolyse von Proteaseinhibitoren (192).

PRSS3 wurde auch in Geweben außerhalb des Verdauungstraktes nachgewiesen. In der Epidermis dürfte PRSS3 für die terminale Differenzierung von Keratinozyten wichtig sein (199); durch Aktivierung zweier wichtiger Zymogene könnte es am Vorgang der Desquamation beteiligt sein (200). Eine erhöhte Expression von *PRSS3* wurde im Gewebe von Diabetes mellitus Typ 2 Patienten nachgewiesen (201). Durch Hochregulierung von Mesotrypsin in Endothelzellen kommt es zur Degradation des Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 (TFPI-2), deshalb wird *PSSR3* mit Zellmigration und angiogenetischer Stimulation assoziiert (202).

Proteasen sind also sezernierte Faktoren, die eine wichtige Rolle bei der Homöostase verschiedenster Gewebe spielen. Das Vorkommen von PRSS3 im Muskelgewebe wurde noch nicht gezeigt, weshalb ein Zusammenhang zu Pathogenese zu diesem Zeitpunkt nicht zu ziehen ist.

Zu RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 8 (RGPD8) konnten keine aussagekräftigen Veröffentlichungen gefunden werden, daher wird nachfolgend auf eine Interpretation über den Zusammenhang dieser Mutation mit der Pathophysiologie der DM verzichtet.

Acidic Nuclear Phosphoprotein 32 B (ANP32B) gehört zur Familie der ANP32 Proteinfamilie und ist neben ANP32A ein wichtiger Kofaktor der viralen Influenzapolymerase, da es für die Transkription und Replikation des Virusgenoms in humanen Zellen wesentlich ist (203). Außerdem konnte in den letzten Jahren die Aktivität von ANP32B mit einer Reihe essenzieller Zellfunktionen in Verbindung gebracht werden: mit der Proliferation neuronaler Stammzellen, der Regulierung der Transkription bestimmter Gene aufgrund von Histon-Chaperon Aktivität, und der Zellzyklusprogression von G1 zur S-Phase (204-208). ANP32B kann darüber hinaus als negativer Regulator der Caspase-3-abhängigen Apoptose fungieren und für die Differenzierung leukämischer Zellen wichtig sein (209-211). Systemischer knockout von ANP32B in Mäusen hat einen fatalen Einfluss auf die Embryogenese mit letalem Ausgang (212). Knockout von ANP32B in adulten Mäusen führt nach Induktion einer experimentellen Autoimmun-

Encephalomyelitis allerdings zu einer erhöhten Transkription proinflammatorischer Gene, welche vor allem für die T-Zell-Aktivierung und –Expansion wesentlich sind, wie IL-2, IL-2Ra/b, IL-4R, CD4, CD5, CD37, TNFR, TLR9, AKT3/1, JAK3 und GRB7 (213). Im Milzgewebe von adulten *ANP32B* knockout Mäusen, bei denen eine EAE induziert worden war, konnte ein exhausted Phänotyp auf Milzzellen in Form von PD1 und CTLA-4 Expression beobachtet werden. Die klinischen Symptome der AN32B knockout Mäuse korrelierte mit der Depletion naiver T-Effektor-Zellen, der Ermüdung von Lymphozyten und dem verstärkten Vorkommen von follikulären T-Helfer-Zellen (213). Diese Studie konnte somit zeigen, dass ANP32B im Mausmodell eine immunmodulatorische Rolle während einer Inflammation übernimmt.

Und auch in der Entstehung von Krebs übernimmt ANP32B offenbar eine Schlüsselrolle: in malignem Gewebe von Patienten mit Brustkrebs findet sich eine höhere Expression dieses Proteins als im naheliegenden gesunden Gewebe und ANP32B-Defizienz reguliert die Phosphorylierung von AKT herunter, wodurch dessen regulierender Effekt auf Zellwachstum beeinflusst wird (214).

Ein kausaler Zusammenhang der *ANP32B* Mutation mit der Pathophysiologie der DM könnte auf zwei beobachteten Phänomenen basieren: einerseits auf der beobachteten Transkription proinflammatorischer Gene, die für die T-Zell-Aktivierung wesentlich sind. ANP32B hat andererseits einen Einfluss auf die AKT-Phosphorylierung, wodurch letztendlich das Zellwachstum beeinflusst wird und die regulierende Funktion von AKT entfällt.

All diese Überlegungen betreffen Dermatomyositis als Gesamtentität, jedoch waren im Besonderen auch die AK spezifischen Veränderungen interessant.

5.1.2. AK spezifische Gene

MAPK- beziehungsweise PI3K/AKT-Signalweg interagieren, lässt die Vermutung zu, dass eine oder beide Signalwege in die Pathogenese von DM involviert sein könnten. Für eine genaue Ausführung zum PI3K/AKT-Signalweg siehe 5.2.2, Seite 107.

Zu Ubiquitin Specific Peptidase 17 Like Family Member 10 (USP17L10) konnten keinerlei Veröffentlichungen gefunden werden, daher kann an dieser Stelle über einen möglichen Zusammenhang zwischen der bei unseren Patienten gefundenen Mutation mit der Ätiologie der DM keine Aussage getroffen werden. Beachtenswert ist, dass USP17

(Ubiquitin-specific Protease 17), einem Mitglied der Deubiquitinasen-Familie, eine onkogene Wirkung zugesprochen wird, da es in einer Reihe solider Tumore überexprimiert wird und dort das Voranschreiten des Zellzyklus von G1 in die S-Phase unterstützt und zur Zellproliferation beiträgt (243). Bei Patienten mit NSCLC, die eine EGFR-Mutation aufweisen, ist USP17 für eine onkogene Signalweiterleitung notwendig (244). Andererseits konnte beobachtet werden, dass eine USP17 Überexpression in Krebszellen zu Apoptose führt (245). Eine solche Tumorsuppressorfunktion konnte zum Beispiel beim Mamma-Karzinom nachgewiesen werden (246). Eine andere Studie wiederum fand heraus, dass USP17 durch regulatorische Mechanismen die zelluläre Seneszenz verhindert (247). Auch die Involvierung von USP17 in den ERK-Signalweg wichtig für die Zellproliferation- über Deubiquitinierung von ELK-1, ein durch ERK aktivierbarer Transkriptionsfaktor, konnte bereits erwiesen werden (248). Auf Grundlage dieser Daten kann aber kein klarer Zusammenhang mit der Pathogenese der DM hergestellt werden.

Die genaue Relevanz der bei unseren Patienten aufgetretenen Mutation muss zu einem späteren Zeitpunkt neu evaluiert werden, da der Datensatz derzeit noch nicht ausreichend ist und eingehende Untersuchungen hierzu noch notwendig sind.

Insgesamt konnten wir also Gen-Signaturen identifizieren, die sich klar einer oder zwei AK Gruppen zuordnen ließen, was sehr gut zu dem Kontext der unterschiedlichen, aber distinkten Phänotypen der AK Subgruppen von DM passt. Die dünne Datenlage ermöglicht derzeit aber keine Interpretation über die Funktion der hier entdeckten, AK spezifischen, Gene bei der Pathophysiologie von DM. Wenn zukünftige Forschungsarbeiten die biologische Funktion dieser Gene offenlegen können, wird eine Interpretation über deren Zusammenhang mit DM möglich sein.

5.2. Der PD1 Signalweg als Grundlage autoimmuner Reaktionen bei Patienten mit DM

Eine Veränderung des PD1 Signalweges, welcher eigentlich dafür zuständig ist, überschießende Immunantworten und Autodestruktion zu verhindern, könnte zu den autoimmunen Reaktionen führen, die letztendlich in der Erkrankung DM resultieren. Wie in Abschnitt 1.2.3 dargelegt, gibt es viele Hinweise, die für eine Beteiligung von PD1 in der Pathogenese sprechen.

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit durch immunhistochemische Färbungen zeigen, dass in Skelettmuskelbiopsien von Patienten mit DM PD1 positive Zellen zu finden sind, ebenso wie Zellen, die dessen Liganden exprimieren.

Bei den PD1⁺ Zellen handelt es sich in einer Vielzahl der Fälle um CD3⁺ T-Zellen, aber auch CD20⁺ B-Zellen und CD68⁺ Makrophagen können PD1 exprimieren (siehe Abbildung 10). Weiterhin besteht im Falle von CD3⁺ T-Zellen auch eine Kohorte, die diesen Rezeptor nicht auf ihrer Oberfläche trägt (siehe Abbildung 10). Dies bestätigt unseren Verdacht, dass in Muskelbiopsaten von Patienten mit DM T-Zellen vorliegen, die aufgrund dauerhafter Antigen-Exposition und damit verbundener exzessiver T-Zell-Stimulation einen „exhausted“, oder auch als „antigen-experienced“ bezeichneten, Phänotypen aufweisen. Dieser Zustand ist mit einer eingeschränkten T-Zell-Funktion verbunden (249).

Die Expression von PD1 auf aktivierten Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen ist bekannt (66), jedoch bisher noch nicht für DM bewiesen worden. Die Subpopulationen von jeweils PD1⁺ und PD1⁻ Zellen könnte darauf hindeuten, dass sowohl Immunzellen, die die Fähigkeit zur Beendigung einer Immunantwort im Muskel von DM Patienten vorhanden sind, als auch Immunzellen, die aufgrund eines fehlenden PD1 Rezeptors zu einer autodestruktiven Reaktion beitragen, vorausgesetzt beide Populationen sind aktiviert. Jene CD68⁺ Zellen, die PD1 exprimieren, könnten als APCs wesentlich an der Bildung der immunologischen Synapse beteiligt sein, da diese über MHC Klasse II phagozytierte Antigene an T-Zellen und B-Zellen präsentieren und damit eine Immunreaktion auslösen und gleichzeitig per Bindung von PD1 an PD-L1 die Immunantwort beenden.

Der Ligand L1 ließ sich auf vereinzelt Makrophagen nachweisen, wobei diese nur eine Subpopulation darstellten (siehe Abbildung 11). Das Vorkommen von PD-L1 auf Makrophagen bei Patienten mit DM war bisher noch nicht bekannt, jedoch war dies zu erwarten, vor dem Hintergrund, dass die konstitutive Expression von PDL1 auf APCs wie Makrophagen und B-Zellen bereits nachgewiesen werden konnte (66, 250). Die Interaktion zwischen PD1 und PD-L1 dient dazu, die stattfindende Immunantwort zu unterbinden. Makrophagen ohne PD-L1 Expression könnten zu einer autodestruktiven Immunreaktion beitragen, weil die Immunantwort durch das Fehlen von PD-L1 nicht beendet werden kann und die durch PD1 regulierte Selbsttoleranz deswegen verloren

geht. Außerdem war der Ligand 1 auch auf CD4⁺ Zellen nachweisbar. Die Expression von PD-L1 auf T-Helferzellen ist bereits bekannt (250), wurde hier aber erstmalig auch für DM Patienten gezeigt und in den verschiedenen antikörperbasierten Subgruppen spezifiziert. Der Ligand 2 war vielfach auf dem Sarkolemm von Skelettmuskelfasern lokalisiert. In der Untergruppe der Patienten mit Mi-2⁺ AK konnten einzelne PD-L2⁺/CD20⁺ Zellen aufgefunden werden (siehe Abbildung 11).

Hervorzuheben ist, dass in den DM Subgruppen wesentliche Unterschiede bestanden, was die Frequenz der PD1/PD-L1/PD-L2 positiven Zellen und Strukturen betraf sowie die Lokalisation des Rezeptors und der Liganden auf Immunzellen (siehe Abschnitt 4.5). Diese Differenzen lassen sich möglicherweise durch die ohnehin bekannten Unterschiede in der Zusammensetzung des inflammatorischen Infiltrates zwischen den einzelnen DM Gruppen erklären und könnten eine Erklärung liefern, warum vor allem bei Mi-2⁺ Patienten, bei denen insgesamt die meisten positiven Strukturen im PD1 Signalweg detektiert werden konnten, eine vergleichbar schwerere Muskelschwäche auftritt als bei anderen Patienten von DM.

Passend zu dem durch die Immunhistologie gewonnenen Gesamteindruck, dass große Unterschiede zwischen den einzelnen AK Gruppen in Bezug auf das Vorkommen PD1⁺/PD-L1⁺ und PD-L2⁺ Zellen herrschen, konnte auf molekularer Ebene durch die qPCR unterstrichen werden, dass auch die Expressionslevels der Moleküle des PD1 Signalweges unterschiedlich sind; dies galt vor allem für PD1 (siehe Abbildung 9). Es zeigte sich ein hohes Level der Genexpression für *PD1* in der Gruppe der Mi-2⁺ Patienten, gefolgt von einer niedrigeren Expression bei TIF-1 γ ⁺ Patienten. Bei MDA5⁺ Patienten war eine Genexpression von *PD1* nicht detektierbar. Die relativ homogene, erhöhte Expression von *PD-L1* und *PD-L2* in allen AK Gruppen deckt sich ebenso mit den histologischen Ergebnissen. Auch für andere Autoimmunerkrankungen, wie etwa Leber- und Nierenerkrankungen, T1DM oder SLE konnte eine Hochregulierung einer oder beider Liganden bestätigt werden (74, 82, 251-253). Patienten mit T1DM exprimieren PD-L1 auf Insulin-positiven Beta-Zellen des Pankreas; die Expression von PD-L1 konnte in vitro durch die Blockade von JAK verhindert werden (74). Bei Patienten mit SLE korrelierte die Expression von PD-L1 auf Neutrophilen mit der Krankheitsaktivität und der Schwere der Erkrankung (253). Beide Arbeitsgruppen vermuten, dass die Expression von PD-L1 der Verhinderung einer massiven Gewebsdestruktion aufgrund einer dysregulierten

Immunantwort dient, was bedeutet, dass die Interaktion zwischen PD1 und seinen beiden Liganden PD-L1/PD-L2 im Zusammenhang mit der Schwere dieser Autoimmunerkrankungen (74, 253).

Eine Beteiligung des PD1 Signalweges scheint auch in der Pathogenese der DM denkbar. Die unterschiedlich stark ausgeprägte Expression von PD1 und seinen beiden Liganden in den DM Subgruppen deutet darauf hin, dass der Signalweg bei Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patienten relevanter ist als bei MDA5⁺ Patienten. Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patienten zeigen generell in Skelettmuskelbiopsien mehr Immunzellen und mehr Entzündungsinfiltrate als Muskelbiopsien von MDA5⁺ Patienten (121, 254). Eine Veränderung im inhibitorischen, für Selbsttoleranz wesentlichen, PD1 Signalweg könnte bei Mi-2⁺ Patienten oder TIF-1 γ ⁺ Patienten wesentlich mehr Auswirkungen haben als bei MDA5⁺ Patienten, die per se wenig Inflammation aufweisen. Analog zu den beiden oben genannten Forschungsgruppen, könnte die Expression der beiden Liganden auch bei Patienten mit DM vor einer schwerwiegenden Gewebsdestruktion schützen. Dazu passt das Ergebnis dieser Studie, dass die Liganden bei Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patienten, welche auch mehr Gewebsdestruktion im Muskelgewebe aufwiesen, vermehrt auftraten.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patienten stärker von einem verändertem PD1 Signalweg betroffen sind als MDA5⁺ Patienten. Daraus ergibt sich folgende Überlegung für Therapiemöglichkeiten von Patienten mit DM: die hier präsentierten Daten legen nahe, dass Mi-2⁺ und TIF-1 γ ⁺ Patienten von Therapien profitieren können, welche den PD1 Signalweg modulieren. Vorstellbar wäre auch, dass eine Korrelation zwischen dem Therapieansprechen von Patienten mit DM und der Expression von Molekülen des PD1 Signalweges besteht. Dies hätte bedeutende Konsequenzen für das klinische Monitoring von Patienten. Eine genauere Untersuchung dieses Zusammenhanges dürfte daher vor allem für diese beiden Patientengruppen von großem Wert sein. Bei MDA5⁺ Patienten würde man basierend auf unseren Daten eher keine therapeutische Modulation des PD1 Signalweges anstreben.

5.2.1. Genetische Grundlagen als Ursache eines gestörten PD1 Signalweges

Nachdem wir zeigen konnten, dass einerseits Veränderungen des PD1 Signalweges sowohl histologisch im Skelettmuskel von DM Patienten nachweisbar waren als auch auf molekularer Ebene eine erhöhte Expression bewiesen werden konnte, widmeten wir uns dem zweiten Teil der aufgestellten Immuncheckpointhypothese: den möglichen genetischen Ursachen für den dysregulierten PD1 Signalweg.

Wir konnten durch die Ergebnisse der WES zeigen, dass es einerseits veränderte Gene gibt, die in unserer gesamten DM Kohorte verändert waren und daher als DM spezifisch betitelt werden können und andererseits auch Mutationen, die für eine AK Subgruppe spezifisch waren und somit eher als AK spezifisch bezeichnet werden können. Bei diesen genetischen Veränderungen handelt es sich wahrscheinlich nicht um direkt krankheitsauslösende Mutationen; vielmehr können wir davon ausgehen, dass es sich um Gene handelt, die eine Prädisposition für DM darstellen und zu einem Ausbruch der Erkrankung, nach Exposition durch einen derzeit unbekanntem weiteren „impact“ zum Beispiel einen Umwelteinfluss, führen, wie dies zum Beispiel bei SLE der Fall ist (132). Wie bereits zuvor beschrieben, ist für den SLE sogar nicht nur eine prädisponierende, „susceptibility“ Signatur, sondern auch eine Signatur für die Krankheitsaktivität und Schwere der Erkrankung bekannt. Einen ähnlichen prädisponierenden Faktor stellen Polymorphismen in den humanen Leukozyten Antigen (HLA) Genen dar. Die Assoziationen zwischen Mutationen in den HLA Genen und der Entwicklung von Autoimmunerkrankung ist bereits lange bekannt: ankylosierende Spondylitis und HLA-B27, Zöliakie und HLA-DQ1, rheumatoide Arthritis und HLA-DRB1, sowie T1DM und HLA-DR3/4 sind nur einige Beispiele dafür (255). Auch für DM sind Assoziationen für HLA-Polymorphismen bekannt, welche je nach ethnischen Hintergrund und Alter variieren können (121).

Nachfolgend soll kurz auf die gefundene Literatur über die verschiedenen Gene, die sich bei der untersuchten Patientenkohorte verändert zeigten, und den Zusammenhang mit verschiedenen Aspekten der DM, vorrangig jedoch auf die Pathogenese eingegangen werden. Sollten noch keine relevanten Daten zu den einzelnen Genen existieren, wird auf eine hypothetische Interpretation verzichtet.

5.2.2. Gene des PD1 Signalweges

Über eine Suche mit einer Liste an Kandidatengenen von Molekülen, die Teil des PD1 Signalweges sind, wurden bei unserer Patientenkohorte sechs Gene mit Mutationen gefunden: *PIK3C2G* und *PIK3C3*, *HRAS*, *ITPR3*, *EOMES* und *B3GAT1*.

Das Gen *PIK3C2G* war bei zwei Patienten, das Gen *PIK3C3* war bei einem Patienten verändert. Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks) sind Lipidkinasen, die an einer Vielzahl an intrazellulären Signalkaskaden beteiligt sind: sie spielen eine essentielle Rolle für den Zellzyklus, die Zellprogression, die Zellmigration und das Zellwachstum (256). Sie vermitteln ihre Wirkung durch reversible Phosphorylierung von Inositol-Lipiden, welche dadurch ihre Aufgabe als Signalvermittler in vielen intrazellulären Signalwegen übernehmen (257). Die Familie der PI3Ks wird aufgrund ihrer Konfiguration, Substratspezifität und Regulationsmodus in 3 Gruppen unterteilt; *PIK3C2G* gehört zu Gruppe der Klasse II PI3Ks, *PIK3C3* ist das bislang einzig bekannte Mitglied der Klasse III PI3Ks (258). Klasse I PI3Ks katalysieren eine Reaktion, die zur Rekrutierung bestimmter Effektormoleküle- wie etwa AKT- führt (259). Die Aktivierung von AKT zieht die Phosphorylierung einer großen Anzahl von Downstream-Effektormolekülen nach sich, die in Vorgänge des Zellwachstums, des Zellmetabolismus und der Zellmigration involviert sind (260). Auch in Zellen des Immunsystems, wie etwa in neutrophilen Granulozyten (261, 262), B-Zellen (263, 264), Makrophagen (265), dendritischen Zellen (266) und T-Zellen (267-271) übernimmt der PI3K/AKT Signalweg wichtige Funktionen. Ein Beispiel hierfür wäre etwa die Induktion der Produktion von Interferon I durch pDCs (266). Aufgrund der wichtigen Rolle des PI3K Signalweges in der Regulierung des Zellwachstums, ist es insgesamt naheliegend, dass die Inhibierung von PI3K als eine mögliche zielgerichtete Therapie für Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen untersucht wird (272-275).

Eine Studie fand eine Assoziation zwischen der Kopienanzahl von *PIK3C2G* mit dem Outcome von Patienten mit kolorektalem Karzinom (CRC): sie soll eine Aussage über das Wiederauftreten von CRC-Rezidiven und das generelle Überleben bei Patienten ermöglichen, die mit Oxaliplatin-basierten Therapeutika behandelt wurden (276).

Auch für Patienten mit Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises, rheumatoider Arthritis und Psoriasis, wird eine mögliche positive Wirkung oben genannter Inhibitoren diskutiert (277, 278). Eine etwas ältere Studie fand eine erhöhte Aktivierung der PI3K/AKT Signalweges in peripheren T-Zellen bei SLE Patienten (279). Eine weitere Studie fand

folgenden spannenden Zusammenhang von SLE mit PI3K/AKT: Patienten mit SLE wiesen einen senszenten Phänotyp auf mesenchymalen Stammzellen auf, welcher durch Inhibierung des PI3K/AKT Signalweges reversibel war (280). PIK3C3 spielt ebenfalls eine Rolle im Metabolismus und bei der Funktion von T-Zellen: T-Zellen mit einer fehlerhaften Funktion von PIK3C3 zeigten einen gestörten Zellmetabolismus, CD4⁺ T-Zellen mit einer PIK3C3-Defizienz konnten sich nicht in T-1-Helferzellen differenzieren (281). Es ist nicht verwunderlich, dass eine genetische Variante in der Promoterregion von *PIK3C3* mit einem speziellen serologischen Phänotyp in Afro-Amerikanischen SLE Patienten assoziiert ist (282). Die Inhibition des PI3K/AKT Signalwegs- wie etwa durch PD1- führt über eine weitreichende Signalkaskade zur Inhibition des TCR-Signalweges (283). PIK3C3 ist außerdem in den Vorgang der Autophagie- der Grundlage der Mitophagie- involviert. Mitophagie stellt einen normalen Regulationsvorgang der Zelle dar und ist notwendig, um dysfunktionale Mitochondrien selektiv zu entfernen. Dies ist wichtig, um die Sekretion inflammatorischer Zytokine und Präsentation von mitochondrialen Antigenen zu restringieren.(284)

So kann etwa die IFN-1 Synthese durch Mitophagie unterdrückt werden (285). Bei Patienten mit SLE ist eine fehlerhafte Mitophagie in einer Reihe von Immunzellen bekannt: in T-Zellen etwa (286, 287), oder auch in Neutrophilen, wo es durch eine defekte Mitophagie zur Sekretion von (ox)-mtDNA und konsekutiv zur Ausbildung von Autoantikörpern, Aktivierung von DCs und Interferon Typ 1 Produktion kommt (288, 289). In Zusammenschau der gefundenen Daten dürfte ein kompromittierter PI3K/AKT Signalweg bei Patienten mit DM- wie er bei den hier untersuchten Patienten durch die Mutationen in den Genen *PIK3C2G* und *PIK3C3* vorliegen könnte- sowohl eine Erklärung für die PD1-Hypothese als auch die IFN-Hypothese bieten, da wir neben diesen beiden Mutationen zusätzlich eine Mutation im Gen für HRAS gefunden haben, welches ebenfalls über eine Beeinflussung des PI3K/AKT Signalweges für die Pathophysiologie der DM verantwortlich sein könnte. Diese Schlussfolgerung wird- neben der jetzigen Datenlage- dadurch unterstützt, dass insgesamt vier der untersuchten 12 Patienten Mutationen in Genen für Moleküle aufwiesen, die direkt zu dieser Signalkaskade gehören (*HRAS*, *PIK3C2G* und *PIK3C3*). Zusätzlich zeigt ein weiterer Patient eine Veränderung im Gen *PIK3C2B*. Diese genetische Veränderung im Gen *PIK3C2B* war allerdings häufig in der Allgemeinbevölkerung vorhanden. Insgesamt hatten also knapp die Hälfte aller Patienten eine Veränderung in dieser Signalkaskade. Würde man nun noch die Gene hinzuzählen, die laut Datenlage zumindest eine Verbindung zum PI3K/AKT Signalweg

besitzen- *ANP32B*, *USF3*, *MET*, *SYTL1*- so hätten elf von zwölf Patienten zumindest eine Mutationen in einem Gen, dessen Molekül den PI3K/AKT Weg beeinflusst.

HRAS zeigte bei einem Patienten eine Mutation auf. Harvey Rat Sarcoma (*HRAS*) gehört zur RAS Familie, eine Gruppe von GTPasen, die eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von humanen Malignomen übernehmen (290). In 20-30% aller Karzinome des Menschen - darunter häufig vorkommende Entitäten wie das CRC, Bronchial-Karzinom oder auch das Pankreas-Karzinom - lassen sich aktivierende RAS Mutationen nachweisen (290-292). Üblicherweise sind solche RAS Mutationen mit einer schlechten Prognose und relativer Therapieresistenz vergesellschaftet (291). Verschiedenste Effektor-Signalwege der RAS Familie konnten bereits identifiziert werden. Zu ihnen gehören zum Beispiel die Signalwege Raf/MEK/ERK MAPK, PI3K/AKT, Ral-GEFs und Phospholipase C ϵ (293). *HRAS* im speziellen ist an Signalwegen verschiedener Immunzellen und der Regulierung von Immunzell-Infiltration in Tumore beteiligt (294, 295). Interessanterweise wird auch der PI3K/AKT Signalweg durch *HRAS* beeinflusst (296).

Das Gen *ITPR3* zeigte sich bei einem Patienten als verändert. Inositol-1,4,5-Triphosphat-Receptor Type 3 (*ITPR3*) ist ein intrazellulärer Ca^{2+} Kanal. Durch Bindung von Inositoltrisphosphat ($InsP_3$) an diesen Rezeptor kommt es zur Ca^{2+} Depletion aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER); *ITPR3* mediiert innerhalb der Zelle über den Second Messenger Ca^{2+} eine Reihe von Zellfunktionen, unter anderem Sekretion, Proliferation, Metabolismus der Mitochondrien und Apoptose (297-301). Verbindungen zu verschiedenen autoimmunen Erkrankungen sind bereits bekannt. Bei Patienten mit Sjögren Syndrom konnte in Speicheldrüsenzellen eine Reduktion von *ITPR3* nachgewiesen werden (302). SNPs im Gen für *ITPR3* sind sowohl mit der Suszeptibilität für SLE als auch mit der Entwicklung von Koronararterien-Aneurysmata bei Kindern mit Kawasaki-Syndrom assoziiert (303, 304). Und auch möglich zugrunde liegende Mechanismen wurden bereits erforscht: B-Zellen spielen innerhalb der Entwicklung von Autoimmunität eine wichtige Rolle, zumal sie nicht nur Autoantikörper produzieren können, sondern auch als APCs Autoantigene autoreaktiven T-Zellen präsentieren (305, 306). Antigenbindung an den B-Zellen-Rezeptor (BCR) führt über eine Signalkaskade zur Bindung von $InsP_3$ an *ITPR3*, wodurch wiederum ein breites Spektrum an Signalwegen der B-Zell-Reifung und B-Zell -Aktivierung etwa- initialisiert wird (307). Eine Mutation in *ITPR3* kommt also durchaus als ein prädisponierender Faktor für die Entwicklung von

DM in Frage vor allem, weil es wesentlich in die Regulation von B-Zellen involviert ist. Eine Mutation in diesem Gen könnte eine Erklärung für die bei DM Patienten bekannte Autoantikörperproduktion und damit verbundene fehlgerichtete T-Zell-Aktivierung dienen.

Im Gen *EOMES* ließ sich bei einem Patienten eine Mutation detektieren. Eomesodermin (EOMES) gehört zur Familie der T-Box Transkriptionsfaktoren und spielt eine wichtige Rolle, sowohl für die Funktion als auch die Homöostase von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen sowie NK-Zellen (308, 309). EOMES ist ein Marker für T Zell „exhaustion“ (T-Zell-Ermüdung; verminderte Stimulierbarkeit der T Zelle) (308, 310), der für eine Reihe an Autoimmunerkrankungen bedeutsam ist: im Gewebe von Patienten mit sporadischer IBMs (110) und Psoriasis (311) konnte eine vermehrte Expression von EOMES gefunden werden, ebenso im Blut von Patienten mit SLE (312); bei Patienten mit MS zeigt sich hingegen eine signifikant geringere Expression (313).

Durch GWAS wurde EOMES aufgrund seiner wichtigen Rolle für die Regulierung von TH17-Zellen als ein genetischer Risikofaktor für die Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis etabliert (314, 315). SNPS im Gen für EOMES sind mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer speziellen Form der MS in der chinesischen Bevölkerung assoziiert (316). Insgesamt wird aktuell die Hypothese vertreten, dass eine kontrollierte Expression von EOMES die Immunantwort von CD8⁺ Effektorzellen reguliert und die Entfernung von Pathogenen unterstützt (317-319); allerdings wird auch vermutet, dass aufgrund einer unregulierten Expression dieses Moleküls auf autoreaktiven T-Zellen eine verminderte Toleranz und Autoimmunität die Folgen sein könnten (320). Es ist auch bereits bekannt, dass EOMES als Reaktion auf Autoantigene induziert wird, allerdings nur, wenn die Antigen-Präsentation unter inflammatorischen Bedingungen abläuft (320). In einer ähnlichen Überlegung scheint auf Grundlage der präsentierten Daten auch der Zusammenhang zwischen EOMES und DM schlüssig: eine genetische Mutation im Gen für EOMES könnte zu einer genetischen Disposition für eine verringerte Eigentoleranz und erhöhte Wahrscheinlichkeit für Autoimmunität darstellen, wenn es durch sie zu einer unregulierten Expression von EOMES kommt.

Bei einem Patienten ließ sich eine Mutation im Gen *B3GAT1* finden. Beta-1,3-Glucuronyltransferase 1 (B3GAT1) ist eine Glucuronyltransferase, die für die Biosynthese von Human natural killer-1 (HNK-1), auch als CD57 bekannt, wesentlich ist (321). CD57 ist ein wichtiger Biomarker, der eine genaue Auskunft über den T-Zell-Phänotypen

erlaubt. Er wird auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im späten Stadium ihrer Differenzierung exprimiert (322), wobei CD57⁺/CD8⁺ T-Zellen signifikant häufiger vorkommen (323). Bei CD8⁺ Zellen stellt CD57 einen Biomarker für die terminale Differenzierung dar, die durch eine reduzierte Proliferationsrate als Antwort auf TCR Aktivierung und erhöhte Empfänglichkeit für Antigen-induzierte Apoptose gekennzeichnet ist (324). T-Zell Seneszenz umfasst darüber hinaus auch- unter anderem- die reduzierte Expression der kostimulierenden Moleküle CD27/CD28 (322, 325). Obwohl CD8⁺/CD57⁺ T-Zellen als „gealterte“ Zellen bezeichnet werden können, so sind sie jedoch keine „ermüdeten“ (exhausted) T-Zellen (siehe oben.), denn T-Zell-Ermüdung basiert im Gegensatz zu T-Zell-Alterung auf dem Verlust der T-Zell Funktion aufgrund ständiger Antigen-Präsentation (326). Das Vorkommen von CD28⁺/CD57⁺ T-Zellen im peripheren Blut ist zum Beispiel bei Morbus Basedow, ankylosierender Spondylitis und rheumatoider Arthritis bekannt; und auch das Vorkommen dieser Zellen im geschädigten Gewebe von Patienten mit Dermatomyositis, Polymyositis und IBM wurde bereits beschrieben (323, 327, 328).

Auch CD28⁺/CD57⁺ T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der autodestruktiven Immunantwort und dürften mit einer schwereren Krankheitsmanifestation assoziiert sein (110). Bei Patienten mit irMyositis und assoziierter Immun-Myokarditis konnten CD57⁺ T-Zellen nachgewiesen werden, die allerdings eine geringe Expression von CD28 und PD1 aufwiesen (322). Und auch bei Patienten mit sporadischer IBM konnten bereits mehrfach CD57⁺ Zellen nachgewiesen werden (110, 327). Vor dem Hintergrund, dass bei Patienten bereits T-Zellen mit einem CD28⁺/CD57⁺ Phänotyp nachgewiesen werden konnten, scheint es plausibel, dass eine Mutation im Gen *B3GAT1* dafür verantwortlich sein könnte, zu einer dysregulierten T-Zell-Funktion beitragen und so die Pathogenese von DM unterstützen.

Zusammenfassend ist im Zusammenhang mit der PD1 Hypothese also speziell die Immunregulation und im Besonderen der PI3/AKT Signalweg von Interesse. Hier könnten weitere Untersuchungen in einer größeren Kohorte sinnvoll sein, um die hier präsentierten Daten zu untermauern. Sinnvoll wäre in diesem Zusammenhang zum Beispiel die Expression der Moleküle des PI3/AKT Weges im Muskelgewebe und auch im Blut von Patienten mit DM. Auch histologische Färbungen der Proteine von *PIK3C2G*

und *PIK3C3*, *HRAS*, *ITPR3*, *EOMES* und *B3GAT1* von Muskelgewebe könnte darüber Aufschluss geben, inwieweit dieser Signalweg zur Pathophysiologie von DM beiträgt.

5.3. Ursprung der Interferon-Signatur

Neben der spannenden Frage nach allgemeinen Prädispositionen bei DM Patienten, oder der Prädisposition einzelner AK-Subgruppen, stellten wir uns auch die Frage, inwiefern andere Signalwege, Faktoren oder auch Moleküle eine Rolle spielen könnten.

Durch die bereits aufgeworfene Frage der Interferon-Signatur und ihrer Auswirkung auf DM haben wir uns mit genetischen Veränderungen in diesen Genen beschäftigt. Der Entstehungsmechanismus morphologischer Merkmale in Muskelbiopsien von Patienten mit DM, wie die perifaszikuläre Atrophie oder Vaskulopathie, sind noch nicht im Detail bekannt; die aktuelle Datenlage legt allerdings nahe, dass die Entwicklung von PFA in Zusammenhang mit lokaler Hypoxie steht (38, 42, 44, 329). Eine weitere Hypothese sieht die Überproduktion einer Klasse von Immunmolekülen, der Interferon Typ 1-induzierbaren Proteine, als Ursache: atrophe perifaszikuläre Muskelfasern könnten die Folge ihrer eigenen Überexpression von IFN-1 Molekülen sein (48). Die antiproliferativen Effekte, die IFN-1 auf einer Vielzahl von Zellen entfaltet, sind weithin bekannt (330-332). IFN- α war der erste antiangiogenetisch wirkende Faktor, der entdeckt wurde (333).

Interferon Typ 1 wird als maßgeblicher Faktor in der Pathogenese von vielen Autoimmunerkrankungen gesehen, wie etwa SLE (127, 129, 334-336), Myositis (31, 49, 50, 337), Sjögren Syndrom (338-340), RA (341-344) und sekundär sklerosierender Cholangitis (SSc) (345-347).

In der vorliegenden Studie haben wir durch Analyse einer Liste an IFN Kandidatengenen untersucht, ob bei Patienten mit DM eine Veränderung dieser Gene vorliegt. Dabei konnten wir durch Analyse der WES Daten zeigen, dass die distinkte vorbeschriebene Expression der Proteine und Gene der IFN-Signatur nicht zur Gänze durch genetische Veränderungen bei Patienten mit DM erklärt werden kann.

Zwar wies jeder Patient zumindest eine Mutation in einem Gen der IFN-Signatur auf, doch waren diese aufgrund ihrer Verbreitung in der Allgemeinbevölkerung nicht als primäre Krankheitsursache zu sehen. Es zeigte sich außerdem kein klares Muster, weder für die gesamte Kohorte noch für die einzelnen AK Subgruppen (siehe Abschnitt 4.7). Um diesen Eindruck zu bestätigen, bedarf es noch eingehender Forschung, vor allem

Untersuchungen von wesentlich mehr Patienten, um eine bessere Aussagekraft zu erzielen. Die IFN-Signatur, die bei DM Patienten gesehen werden kann, könnte auch auf epigenetischer Basis entstehen, durch DNA Methylierung oder Histon-Modifikationen, auch hierfür wäre noch weitere eingehende Forschung nötig.

Dafür spricht die Tatsache, dass wir bei den Patienten in unserer Kohorte Gene ausfindig machen konnten, die klar zur Interferon-Signatur gehören, allerdings bei vielen Menschen in der Allgemeinbevölkerung verändert auftraten, sodass es daher unwahrscheinlich ist, dass sie die alleinige Ursache für eine seltene Erkrankung wie DM sind. Im folgenden Abschnitt sollen daher sowohl die Gene besprochen werden, die aufgrund ihrer Carrierzahl eher als Prädisposition gesehen werden können, als auch die Gene, die wahrscheinlich eher eine primäre Rolle in der Pathogenese von DM spielen.

5.3.1. Prädisponierende Gene der IFN-Signatur

Mutationen in den folgenden Genen konnten als prädisponierende Gene der IFN-Signatur bei Patienten mit DM identifiziert werden: *HLA-A*, *HLA-B*, *IFIH1*, *IFI16*, *JADE2*, *JAK2*, *MAPK14*, *MET*, *MX1* und *SYTL1*. Aufgrund der Zusammengehörigkeit wird die Bedeutung der *HLA-AA* und *HLA-B* Mutationen im Abschnitt mit *HLA-DRB1* besprochen (siehe Abschnitt 5.3.2). Die Bedeutung einer Mutation im Gen *JAK2* wird aufgrund der Zusammengehörigkeit zu *STAT1* in dessen Abschnitt besprochen (siehe Abschnitt 5.3.2). Die Aufgabe, die eine *JADE2* Mutation als prädisponierender Faktor in der Entwicklung einer Dermatomyositis spielen könnte, bleibt aufgrund der geringen Datenlage vorerst unklar.

Das Gen *IFIH1* war bei insgesamt 3 Patienten verändert; zwei davon hatten einen positiven TIF-1 γ AK, einer einen positiven MDA5 AK. Dieses Gen ist auch unter dem Namen Anti-Melanoma Differentiation-associated Gene 5 (MDA5) bekannt. Die nukleare RNA-Helikase IFIH1 könnte auf Basis dieser genetischen Veränderung die Produktion der Autoantikörper auslösen oder zumindest mit beeinflussen. AK gegen MDA5 sind mit einem sehr speziellen klinischen Krankheitsbild verbunden, das sich wesentlich von dem der klassischen DM unterscheidet und als klinisch amyopathische DM bezeichnet wird. Die starke Spezifität des Anti-MDA5 AK machen ihn zu einem wertvollen Biomarker (48). Neben klinischen Aspekten ist auch eine gewisse Divergenz in Bezug auf die Interferon-Signatur bekannt: verglichen mit gesundem Muskelgewebe zeigen sowohl Biopsien

klassischer DM als auch Biopsien von MDA5⁺ Patienten eine Hochregulierung IFN-induzierter Gene, jedoch ist die Überexpression in Patienten mit MDA5 AK signifikant geringer (30). Darüber hinaus exprimieren Muskelfasern verschiedene Proteine der Gruppe der ISGs auf unterschiedlichen Levels: RIG-I und ISG15 lassen sich auf Muskelfasern der perifaszikulären Region bei Patienten mit klassischer DM nachweisen; doch nur 50% der MDA5⁺ Patienten wiesen eine vergleichbare Expression von RIG-I auf und kein Patient zeigte eine Expression für ISG15 (30). Der IFN-Signalweg scheint bei Patienten mit MDA5⁺ AK im Vergleich zu Patienten mit klassischer DM daher weniger stark aktiv zu sein. SNPs im Gen *IFIH1* konnten bei Patienten mit SLE identifiziert werden (348).

Zwei Szenarien scheinen als Erklärung für den Zusammenhang einer Mutation im Gen *IFIH1* mit der DM Pathogenese denkbar: bei MDA5⁺ Patienten könnte eine Veränderung im Gen *IFIH1* im Verlauf ihrer Erkrankung zu einer verstärkten Expression oder Veränderung und in Folge zur Ausbildung von Autoantikörpern führen. Darüber hinaus könnte diese Mutation auch zu einer krankhaften Veränderung und abgeschwächten Funktion im IFN-Signalweg führen. Ein anderes Szenario könnte TIF-1 γ ⁺ Patienten aufgrund ihrer Mutation im Gen *IFIH1* für eine wesentlich stärkere IFN-Antwort prädisponiert sehen als Patienten ohne diese genetische Variante.

Interferon Gamma Inducible Protein 16 (IFI16) konnte als einer der wichtigsten Sensoren des angeborenen Immunsystems in eukaryotischen Zellen identifiziert werden (349, 350) und gehört zu der Gruppe der ISG (351). IFI16 aktiviert nach Erkennen von viraler double-stranded DNA (ssDNA) den STING-TBK1-IRF3 Signalweg und induziert so die Interferon Typ I Produktion, was wiederum zur Induktion von mehr IFI16 führt (352-356). Es konnte gezeigt werden, dass IFI16-Veränderungen bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen auffindbar ist: Bei Patienten mit SLE konnten Autoantikörper gegen IFI16 gefunden werden (357), ebenso bei Patienten mit Sjögren Syndrom (358) und auch bei Psoriasis konnten sowohl IFI16 AK, als auch erhöhte Serumwerte festgestellt werden (359)-Erkrankungen, bei denen eine gesteigerte Interferonantwort eine Schlüsselrolle in der Krankheitsentstehung spielt. Zirkulierendes IFI16 konnte bei Patienten mit RA- wo ebenso Anti-IFI16 AK gezeigt werden konnten- nachgewiesen werden und korreliert dort mit dem Auftreten von RA-assozierten pulmonalen Erkrankungen (360). In einer kleinen Studie konnte ein Zusammenhang zwischen der Suszeptibilität für Morbus Behçet und SNPs im Gen *IFI16* gefunden werden (361).

Insgesamt scheint es sehr plausibel, dass eine Mutation im Gen *IFI16* eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der DM spielt. Als ein Molekül, das IFN Typ 1 und auch sich selbst induziert, trägt es letztendlich wesentlich zu einer gesteigerten IFN-Antwort bei und könnte über diesen Mechanismus zur Pathogenese der DM beitragen.

Das Gen *JADE2* war bei einem Patienten unserer Kohorte verändert. Jade Family PHD Finger 2 (*JADE2*), oder auch *PHF15*, ist ein Mitglied der JADE Familie und besitzt mit *JADE1* und *JADE3* zwei Paraloge (362). Zu der genauen Funktion von *JADE2* ist derzeit noch nicht viel bekannt. Eine Studie bewies, dass *HBO1*, eine Histonacetyltransferase, die in ovariellen Krebszellen überexprimiert ist, seine Wirkung mithilfe des JADE Komplexes verwirklicht, woraufhin *YAP1*, ein Onkogen für das Ovarial-Karzinom, exprimiert wird (363). Eine andere Studie identifizierte *JADE2* aufgrund seiner möglichen Rolle in der Entwicklung von Alopezie als einen potenzieller Biomarker (364).

Zwei Patienten wiesen Veränderungen im Gen *JAK2* auf, jedoch war nur die Mutation eines Patienten in der Bevölkerung selten vertreten. Auch wenn die Mutation des zweiten Patienten in der Bevölkerung relativ häufig auftritt, so ist eine Veränderung des *JAK2* Gens trotzdem hervorzuheben. Die Bedeutung einer Mutation im Gen *JAK2* wird aufgrund der Zusammengehörigkeit mit *STAT1* in diesem Abschnitt besprochen (siehe Abschnitt 5.3.2, ab Seite 118).

Im Genom eines untersuchten Patienten konnte eine Mutation von *MAPK14* gefunden werden. Mitogen-activated Protein 14 (*MAPK14*), auch *p38 α* , ist eine Kinase, die an einer Vielzahl von zellulären Reaktionen auf extrazelluläre Stimuli beteiligt ist: zu den extrazellulären Stimuli, die eine Aktivierung der *MAPK14* nach sich ziehen können, zählen unter anderem VEGF (vascular endothelial growth factor) und oxidativer Stress bei Zellschädigung durch UV-Strahlung (365-368). *MAPK14* ist maßgeblich an der Regulation von Apoptose, Zellwachstum, Immunantworten und der Antwort auf DNA-Schaden beteiligt: zu dem breiten Spektrum der Substrate von *MAPK14* zählen über 100 Proteine, die sowohl im Zytosol als auch im Nukleus lokalisiert sein können und eine Vielzahl an weiteren Schaltstellen aktivieren können (365); auch Transkriptionsfaktoren, von denen die meisten transkriptionale Aktivitäten triggern, zählen zu den Substraten von *MAPK14* (369, 370).

Auch die Produktion inflammatorischer Mediatoren, wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF α und COX-2, wird durch MAPK14 reguliert (371). Die Assoziation zwischen chronischer Inflammation und der Entwicklung von Neoplasien ist für eine Reihe von Krebserkrankungen bekannt: so wird die Entwicklung des Magen-Karzinoms mit einer chronischen Entzündung durch *Helicobacter pylori* in Verbindung gebracht (372), und das Kolon-Karzinom mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (373). Durch Modulation der Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen wie E-Selectin- wodurch zirkulierende Krebszellen ins Endothel eindringen können- kann eine Entzündung zur Entwicklung einer Krebserkrankung beitragen (365). Der Prozess der E-Selectin abhängigen Adhäsion wird in Teilen durch Aktivierung des MAPK14 Signalweges unterstützt (374, 375). Dies macht deutlich, welche wichtige Rolle in der Tumorentstehung aufgrund von Inflammation von MAPK14 übernommen wird. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte sogar zeigen, dass ein Singulärer Nukleotid Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) von MAPK14 mit der Entwicklung eines Prostata-Karzinoms assoziiert ist (376). Eine familienbasierte GWAS konnte einen Zusammenhang zwischen SNPs in einem Intron von *MAPK14* mit Spondylarthritis identifizieren (377). Auch konnte schon eine veränderte Genexpression von *MAPK14* bei Patienten mit dem Kawasaki-Syndrom, einer Vaskulitis gefunden werden (378). Weitere Assoziationen mit autoimmunen Erkrankungen sind noch nicht erforscht. Die genaue Prädisposition und Auswirkungen, die aus der bei unserem Patienten vorliegenden Mutation im Gen *MAPK14* resultieren könnten, sind aufgrund der vielen genannten Aufgaben von MAPK14 schwer absehbar.

Das Gen *MET* wies bei einem Patienten eine Mutation auf. *MET* ist ein Protoonkogen, das den Tyrosinkinase-Rezeptor für den Liganden Hepatozyten Growth Factor (HGF) kodiert und eine wichtige Rolle für die Embryogenese, Wundheilung, Leberregeneration, Angiogenese und Immunmodulation spielt (379-383). Das Resultat der Bindung von HGF an MET ist letztendlich die Aktivierung der MAPK und PI3K-AKT-mTOR Signalwege, die zu Zellmigration und Proliferation führen (384, 385). Deregulierung im MET Signalweg konnten bei Patienten mit NSCLC, Kolon-Karzinom oder Schilddrüsen-Karzinom nachgewiesen werden (386-389). Meist ist diese mit einer schlechten Prognose für den Patienten vergesellschaftet (390). Mittlerweile wird diese Schaltstelle auch als therapeutische Option genutzt: so sind zum Beispiel MET-Inhibitoren zur Therapie des NSCLC bei Patienten mit einer Mutation im EXON 14 bereits entwickelt worden und

sowohl in den USA als auch in Japan zugelassen (386). Eine Studie fand heraus, dass eine Mutation im Gen *MET* einen Link zwischen malignen Erkrankungen und chronisch inflammatorischen Erkrankungen darstellen könnte: untersucht wurden Tumorzellen und CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark von einer 36-jährigen Patienten, die an einem Mamma-Karzinom, Polycythaemia Vera und rheumatoider Arthritis litt. Es fand sich folgende Mutation in beiden Zell-Populationen: pR988C, c2926C>T. Nach Überprüfung eines größeren Patientenkollektives fand sich diese Mutation auch bei zwei weiteren Patientinnen: eine war an einem Mamma-Karzinom erkrankt, eine weitere an Polycythaemia Vera und rheumatoider Arthritis. (391)

Die von uns untersuchte Patientin wies die Mutation pR988C, c2908C>T im Gen *MET* auf. Es handelt sich dabei also nicht um eine Punktmutation an der gleichen Stelle wie bei der oben beschriebenen Patientin, aber Resultat ist die Veränderung der Aminosäure an der gleichen Stelle. Es erscheint wahrscheinlich, dass auch die bei unserer Patientin entdeckte Mutation eine Prädisposition für chronisch inflammatorische Erkrankungen darstellen könnte, auch wenn die durch uns gefundene Mutation mit 340 Carriern in der Normalbevölkerung relativ häufig vorkommt.

Das Gen *MX1*, welches das Protein MXA kodiert, zeigte nur bei einem Patienten eine veränderte genetische Variante. *MX1* wird durch IFN-1 induziert und gehört zu den signifikant am höchsten exprimierten Genen in Skelettmuskel von DM Patienten (392). MXA wird reichlich und in einzigartiger Weise- im Vergleich mit anderen Muskelerkrankungen- auf perifaszikulären atrophischen Muskelfasern und Kapillaren bei Patienten mit DM exprimiert (31). Im klinischen Alltag werden Färbungen für MXA daher verwendet, unter anderem um eine DM von einer AS zu unterscheiden (393).

Bemerkenswert ist, dass wir in der hier untersuchten Kohorte bei einem Patienten eine Mutation im Gen *MX1* fanden. Bei vielen Patienten mit DM wird MXA im Muskelgewebe exprimiert und es dient als wichtiges Unterscheidungsmerkmal gegenüber anderen Muskelerkrankungen. Natürlich muss die Expression von MXA im Muskelgewebe von Patienten nicht allein auf einer veränderten Genvariante basieren, auch ein Kompensationsmechanismus scheint denkbar. Letztendlich stellt MXA ein wichtiges Protein in der Interferonantwort dar, dessen fehlende Funktion auf Basis einer Mutation zu einer abgeschwächten Interferonantwort führen könnte, was wiederum im Kontrast zu der hier bereits beschriebenen Interferon-Hypothese zur Krankheitsentstehung von DM steht. Folge einer genetischen Veränderung könnte allerdings auch eine erhöhte Funktion des ISG MXA sein mit konsekutiv verstärkter Interferonantwort, was die in dieser Arbeit

untersuchte Interferon-Hypothese unterstützen würde. Wenn Zweiteres zuträfe, würde man aber bei mehr Patienten eine Mutation erwarten. Diese spannende Fragestellung kann an dieser Stelle noch nicht beantwortet werden.

Synaptotagmin Like 1 (SYTL1) kann auch als JFC Protein bezeichnet werden und ist durch das Vorhandensein einer Rab-Bindungsdomäne charakterisiert (394, 395). Rab Proteine sind GTPasen, die zur Ras Superfamilie gehören und gemeinsam mit ihren Effektormolekülen verschiedene Schritte innerhalb des intrazellulären Vesikeltransportes regulieren (396). SYTL1 kommt unter anderem in humanen Thrombozyten vor, wo es an RAP1GAP2, welches eine Rolle bei der Exozytose von Granula spielt, bindet (397). Ebenso konnte SYTL1 auf Vesikeln in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden, wo es ebenfalls die Exozytose reguliert (398). SYTL1 ist darüber hinaus an der Koordinierung der Chemotaxis und Migration von Neutrophilen beteiligt, ein Prozess, der durch die direkte Interaktion von SYTL1 mit Rac1-GTP reguliert wird (399). Die Regulation von SYTL1 basiert dabei auf einer AKT-medierten Phosphorylierung (400). SYTL1 übernimmt eine wichtige Rolle für einige Zellen, deren Funktion auf der Exozytose von Vesikeln basiert. Obwohl es als ein zu der bei DM Patienten bekannten IFN-Signatur gehöriges Gen identifiziert wurde, ist nicht genau klar wie es die Ätiologie oder die Pathophysiologie der DM beeinflusst. Das kann aus der derzeitigen Datenlage nicht festgestellt werden.

Neben diesen eher prädisponierenden Genen scheint ein Augenmerk auch auf die im folgenden Abschnitt erwähnten Gene von größerer Relevanz zu sein.

5.3.2. Gene der IFN-Signatur mit möglicher primärer Rolle in der Pathogenese

Folgenden Gene konnten als Gene der IFN-Signatur mit primärer Rolle in der Krankheitsentstehung bei Patienten mit DM identifiziert werden: *HLA-DRB1*, *IFI44L*, *JAK2*, *STAT1*, *TTN* und *TLR4*.

Genomweite Assoziationsstudien (genome-wide association studies, GWAS) konnten darlegen, dass Mutationen im HLA Locus zu den bedeutendsten bekannten genetischen

Faktoren für viele humane Autoimmunerkrankungen zählen; dies hebt die besondere Rolle von T-Zellen in Autoimmunität hervor (401).

In der hier vorgestellten Studie wiesen insgesamt 7 der 12 untersuchten Patienten Veränderungen in dem HLA-Gen *HLA-DRB1* auf, welches den MHC Klasse II kodiert, 6 davon wiesen die identische genetische Veränderung im Gen *HLA-DRB1* auf. *HLA-DRB1* konnte bereits als alleler Risikofaktor in verschiedenen ethnischen Gruppen für idiopathische inflammatorische Myopathien identifiziert werden (402-407). So wird zum Beispiel *HLA-DRB1*03:01* als Risikofaktor für die Entwicklung einer Myositis in der kaukasischen Population gesehen (408, 409). Die Allele *HLA-DRB1*03*, *HLA-DRB1*04*, *HLA-DRB1*07*, *HLA-DRB1*09:01* und *HLA-DRB1*12* wiederum sind signifikante Risikofaktoren für das Vorkommen von DM bei Patienten mit chinesischer Herkunft (407, 410). Darüber hinaus konnte eine Assoziation zwischen *HLA-DRB1*12:01* und anti-MDA5-AK gezeigt werden, und, dass *HLA-DRB1*09:01* mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit MDA5⁺ AK verbunden sein könnte. Spannenderweise zeigen Ergebnisse früherer Studien, dass die Präsenz von ILD und MSA bei Patienten mit DM eher von dem HLA Klasse II Haplotyp kontrolliert wird als von der Myositis Subgruppe (411). Wiederum entwickeln MDA5⁺ Patienten häufig eine rapid progressive ILD (rp-ILD,), die mit einer Überlebensrate von nur 41% verknüpft ist (412). Dies hebt hervor, wie wichtig es ist, über den genauen Zusammenhang zwischen genetischer Veränderung im MHC Klasse II Komplex, MSA und der Ausbildung von ILD informiert zu sein. In unserer Kohorte hatten wie erwähnt insgesamt sieben Patienten Mutationen in diesem Gen, 6 Patienten hatten die gleiche Variante; allerdings waren darunter alle AK Subgruppen vertreten. Vor dem Hintergrund bekannter Daten passen unsere Ergebnisse, weil auch in unserer Kohorte *HLA-DRB1* als alleler Risikofaktor für die DM im Allgemeinen gesehen werden kann; eine spezielle Assoziation zu einer AK-Subgruppe konnte allerdings nicht identifiziert werden.

Mutationen im Gen für den MHC Klasse I Komplex waren bei vier Patienten detektierbar, zwei davon hatten auch Mutationen im Gen für den MHC Komplex II. Das könnte bedeuten, dass die Präsentation von krankheits-triggernden Autoantigenen gegenüber T-Zellen sowohl vom MHC Klasse I Komplex als auch vom MHC Klasse II Komplex übernommen wird. Es scheint denkbar, dass es durch die Beeinflussung des TCR und regulatorischer T-Zellen zu einer Autoreaktion kommen könnte- auf Basis von genetisch veränderten MHC Komplexen. Letztendlich kann hier keine abschließende Aussage

getroffen werden, da noch nicht bekannt ist, über welchen genauen Mechanismus eine Veränderung der HLA Gene zum Entstehen von Autoimmunität beiträgt.

Ein Patient wies eine Mutation im Gen *IFI44L* (Interferon induced Protein 44-like, IFI44L) auf, einem Paralog von *IFI44*, welches zu bekannten Genen der Interferon-Signatur bei DM zählt. *IFI44L* ist ein ISG, dessen Expression durch eine Vielzahl von Viren, wie etwa dem Influenza A Virus und dem respiratorischen Synzytial-Virus (RSV) induziert wird (413, 414).

Vorangegangene Studien ergaben, dass sowohl *IFI44L* als auch *IFI44* Immunantworten des angeborenen Immunsystems, die nach einer Virusinfektion induziert worden waren, negativ modulieren. Seine Wirkung entfalten *IFI44* und *IFI44L* durch Bindung an FKBP5, welches mit Kinasen wie IKK α , IKK β , und IKK ϵ interagiert, die für die Induktion von Typ 1 und Typ 3 Interferonen verantwortlich sind. Durch Bindung von *IFI44* und *IFI44L* an FKBP5 kommt es zu einer Verringerung der Phosphorylierung von IRF-3 und I κ B α , mediiert durch IKK ϵ und IKK β ; Resultat dessen ist eine negative Regulierung der Interferon Antwort des angeborenen Immunsystems. (415, 416)

Folge einer Mutation im Gen *IFI44L* könnte eine Dysregulation des negativen Feedbacks sein, wodurch die negative Rückkopplung verloren geht und in einer gesteigerten Interferonantwort resultiert.

Auch bei anderen autoimmunen Erkrankungen scheint *IFI44L* eine relevante Rolle zu spielen: Bei Patienten mit SLE ist eine Hypomethylierung des Promotors von *IFI44L* bekannt (417-421). Es wird vermutet, dass diese Hypomethylierung mit der Suszeptibilität für SLE positiv korreliert. Eine andere Studie kam zu dem Ergebnis, dass bei SLE Patienten einer chinesischen Population die Hypomethylierung des Promotors von *IFI44L* signifikant höher ist als bei Kontrollpatienten, und deswegen als diagnostischer Marker mit hoher Sensitivität und Spezifität herangezogen werden kann (422). Die Hypomethylierung des Promotors von *IFI44L* kann als ein Versuch des Körpers gesehen werden, eine gesteigerte Interferonantwort zu unterbinden.

Inwieweit epigenetische Veränderungen des Promotors von *IFI44L*, ähnlich wie bei Patienten mit SLE, auch bei Patienten mit DM auftreten, ist noch nicht bekannt, dürfte jedoch aufgrund der ebenfalls gesteigerten Interferon Antwort sehr wahrscheinlich auch vorhanden sein und vermag einen Teil des Pathomechanismus zu erklären.

Das Vorliegen von Mutationen von *JAK2* und *STAT1* bei Patienten mit DM überrascht insgesamt nicht, wurde aber bisher in wenigen Fällen gezeigt. Genetische

Veränderungen in Genen des JAK/STAT Weges bieten eine Erklärung für die Effektivität von Inhibitoren dieses Signalweges, JAK/STAT Inhibitoren, in der Therapie von Patienten mit DM (423-427).

Zwei Patienten wiesen Veränderungen im Gen *JAK2* auf, wovon allerdings nur eine selten in der Bevölkerung war; ein Patient zeigte eine Mutation im Gen *STAT1*. Die Expression IFN-induzierter Gene wird über die Bindung von IFN an den korrespondierenden Oberflächenrezeptor via dem Janus Kinase (JAK)/ Signal Transducer and activator of Transkription (STAT) Signalweg stimuliert (32).

Die Familie der JAK-Moleküle (*JAK1*, *JAK2*, *JAK3* und *TYK2*) spielt sowohl für das angeborene als auch das erworbene Immunsystem eine wichtige Rolle. Dabei sind sie für die Regulation der Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Immunregulation und weiterer Prozesse von grundlegender Bedeutung (428). Die Aktivierung von *JAK2* erfolgt über unterschiedliche Zytokine wie IFN- γ , TNF- α , IL-5, IL-6 und IL-10 (429). Auch *STAT1* wird durch IFN- γ induziert und wird für die Aktivierung von Typ 1 T-Helferzellen benötigt und ist damit ein wichtiger Bestandteil der adaptiven Immunität (430). Es konnte bereits gezeigt werden, dass es in der perifaszikulären Region von Muskelbiopsaten von DM Patienten angefärbt wird (431). Das Auftreten von Mutationen im JAK/STAT Weg bei Patienten mit DM konnte bereits publiziert werden: in einem Case Report schildert Q. Xu et al., 2020 das Auftreten der Mutation *JAK2(V617)* bei einem Patienten mit klinisch amyopathischer Dermatomyositis gemeinsam mit einer essentiellen Thrombozytose (ET) (432). Laut diesem Case Report sei das Auftreten dieser Mutation gemeinsam mit DM nur aus zwei weiteren Fällen bekannt. Bei der *JAK2(V617)* Mutation handelt es sich um eine konstitutiv aktive Form von *JAK2*, die bei bis zu 50% der Fälle bei ET gefunden werden kann (433) und zu einer erhöhten Expression von PD-L1 auf Zellen einer myeloproliferativen Neoplasie führt (434). Die oben genannte Forschungsgruppe konnte in ihrer Datenbank noch weitere Patienten ausfindig machen, die jene Mutation sowie eine Autoimmunerkrankung aufwiesen: dabei handelte es sich um einen Patienten mit „Polymyositis“ und eine Patientin mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis (432). Insgesamt sah die Forschungsgruppe das Auftreten von *JAK(V617F)* mit DM aber eher als ein „zufälliges Zusammentreffen“, als einen kausalen Zusammenhang mit der Pathophysiologie der DM. SNPs in den Genen *STAT1* und *JAK2* sind mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert: so konnte *STAT1* mit systemischer Sklerose (435) und immuner

Thrombozytopenie (436) in Verbindung gebracht werden und *JAK2* mit Morbus Behçet (437).

Toll-Like Rezeptoren (TLR) gehören zu den Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs) und sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems (438, 439). Sie besitzen die Fähigkeit Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPS) zu erkennen und bewirken über eine Signalkaskade, die zur Expression von einer Vielzahl an Zytokinen sowie Chemokinen und einer Reifung von Immunzellen führt, die Aktivierung des angeborenen Immunsystems, wodurch es letztendlich auch zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems kommt (440, 441). Die Aktivierung des TLR4 Signalweges wird aufgrund seiner antikanzerogenen Wirkung bereits als Therapeutikum gegen Malignome verwendet (442).

Es konnte jedoch auch schon gezeigt werden, dass aus der Aktivierung von TLR4 durch eine Reihe von endogenen Molekülen (Damage-associated molecular pattern, DAMPS) auch eine sterile Inflammation resultieren kann - eine Entzündung, die nicht die Folge einer bakteriellen oder viralen Infektion ist, sondern vielmehr das Resultat einer Gewebeverletzung (443, 444).

Die Aktivierung des TLR Signalweges kann zu einer erhöhten Transkription von Genen führen, die IFN-1 kodieren: verschiedene proinflammatorisch wirksame Zytokine, wie etwa TNF- α , IL-1 und IL-6 zum Beispiel, jedoch können auch antiinflammatorische Moleküle wie IL-10 und Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Prostaglandin E2 darunter sein (438, 445). Eine erhöhte Expression von TLRs, vor allem von TLR4 und TLR9, im Muskelgewebe von Patienten mit DM ist bereits bekannt (446-449). Auch konnten SNPs im Gen TLR4 (450) mit einer Reihe von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht werden: SLE (450), Psoriasis (451, 452), RA (450, 453), idiopathische membranöse Nephropathie (454), Vitiligo (455), autoimmune Pankreatitis (456), Zöliakie (457) und Guillain Barré Syndrom (458). Eine genetische Ursache für die erhöhte Expression von TLR4 bei Patienten mit DM wurde noch nicht gezeigt.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei Patienten mit DM eine erhöhte Expression von TLR4 im Skelettmuskel vorliegt, welche mit der Expression von Interferon korreliert (446). Es erscheint also als möglich, dass es durch eine genetische Mutation bei DM Patienten im Gen für TLR4 zu einer Aktivierung des TLR4 und konsekutiv zu einer erhöhten Expression von IFN-1 kommt, woraus schlussendlich die weithin bekannte IFN-Signatur resultieren könnte.

Das Gen *TTN*, welches das Protein Titin kodiert, wies bei 6 Patienten eine genetische Veränderung auf. Titin spielt eine wichtige Rolle im Sarkomerkomplex und ist wesentlich an der Kraftgenerierung beteiligt (459). Es handelt sich dabei um ein riesiges Myofilament- das größte Protein im menschlichen Körper (460)- das sich im Sarkomer von der Z-Scheibe (N-Terminus) bis zu den M-Banden (C-Terminus) hin erstreckt (461-465). Es ist als ein krankheitsverursachendes Gen des Menschen etabliert, welches an der Entstehung vieler kardialer und neuromuskulärer Erkrankungen beteiligt ist (466-475). So konnten vorangegangene Studien zeigen, dass Mutationen im *TTN* Gen mit der Dilatativen Kardiomyopathie (DCM) assoziiert sind (460, 476, 477) und die Prävalenz von *TTN* Mutationen bei Patienten mit DCM signifikant höher ist als bei der Normalbevölkerung (469). Bei der DCM handelt es sich um eine Herzmuskelerkrankung, charakterisiert durch eine Dilatation und systolische Fehlfunktion des linken Ventrikels, oder beider Ventrikel, in Abwesenheit weiterer Herzerkrankungen wie Hypertension, koronare Herzerkrankung oder Valvulärerkrankung (459, 478, 479). Mutationen in *TTN* scheinen familiär gehäuft aufzutreten (480).

Das Vorliegen von Mutationen im Gen *TTN* wird in dieser Arbeit erstmals für Patienten mit DM beschrieben, wurde aber bereits bei anderen Muskelerkrankungen nachgewiesen (237, 481-484). Dadurch wird die Bedeutung des durch dieses Gen kodierten Moleküls für Muskeln hervorgehoben. *TTN* kann außerdem neuesten Erkenntnissen zufolge als Marker für das Ansprechen von soliden Tumoren auf die Therapie mit Immuncheckpoint-Blockaden (ICB) verwendet werden: eine Forschungsgruppe fand heraus, dass *TTN* mit einer erhöhten Mutationslast in Tumoren (tumor mutational burden, TMB) assoziiert ist und mit dem Ansprechen auf Therapie mit ICB korreliert (485). Ein Zusammenhang mit der Pathogenese von DM scheint auf Basis der derzeitigen Literatur sehr wahrscheinlich. Der Nachweis einer veränderten Expression von *TTN* im Muskelgewebe von DM Patienten könnte diese Erkenntnis untermauern

Insgesamt sind dadurch mehrere Schlüsselpunkte des Interferonweges beeinflusst und verdeutlichen dadurch, passend zu den bereits bekannten Daten, wie relevant die IFN-Antwort in DM für die Pathogenese ist. Diese Forschungsarbeit kann daher erstmals zeigen, dass es parallel zu der bekannten Interferon-Signatur im Blut und Muskel von Patienten mit DM auch auf genetischer Ebene Veränderungen in Genen von Molekülen gibt, die zur sogenannten Interferon-Signatur gehören. Somit kann die Interferon-

Hypothese wahrscheinlich auf genetische Ursachen zurückgeführt werden. Weiterführende Forschungsarbeiten müssen für ein endgültiges Fazit aber noch klären, ob die hier entdeckten veränderten Gene auch im Muskelgewebe von erkrankten Patienten exprimiert werden, dies lässt sich zum Beispiel durch eine qPCR aus Muskelgewebe oder auch durch histologische Färbungen von Muskelbiopsien herausfinden. Würde man bei diesen Versuchen fündig werden, könnten sich daraus ebenso neue Therapieoptionen ergeben.

5.4. Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass pathogenetisch relevante Veränderungen des PD1 Signalwegs bei Patienten mit DM vorliegen. Diese Veränderungen lassen sich sowohl histologisch als auch auf molekularer Ebene nachweisen. Auf genetischer Ebene ließ sich keine direkte Mutation in den Genen von PD1 und seinen beiden Liganden nachweisen, doch zeigten sich Mutationen in Genen für Proteine, die mit PD1 und seinen Liganden interagieren. Durch eingehende Literaturrecherche konnten wir herausfinden, dass diese Proteine in wichtige Vorgänge der Zelle involviert sind, wie etwa Proliferation, Zellmigration, Apoptose, Regulierung von Immunantworten oder auch als Bestandteile des Zytoskeletts grundlegende Zellfunktionen erfüllen.

Ein erster Grundstein zum Verständnis der Immuncheckpoint-Hypothese konnte somit gelegt werden. Weitere Studien müssen zeigen, inwieweit die Interaktion zwischen den hier gefundenen Genmutationen und dem PD1 Signalweg zur Entwicklung einer DM führt beziehungsweise führen könnte. Die Expression der hier entdeckten Gene im Muskel von Patienten mit DM könnte mithilfe von histologischen Färbungen dargestellt und mittels qPCR überprüft werden.

Was die Interferon Hypothese anbelangt, so konnten wir zeigen, dass es auch hier Veränderungen in relevanten Genen gibt. Nicht alle Genmutationen waren in der Bevölkerung selten genug, um das Vorkommen einer seltenen Erkrankung wie der DM zu erklären, jedoch könnte die relativ häufige Verbreitung von genetischen Mutationen in Genen der Interferon-Signatur dafür sprechen, dass diese - ähnlich wie eine genetische Prädisposition für SLE bereits bekannt ist - zu einer Prädisposition für DM führen. Nichtsdestotrotz konnten wir auch seltene Genmutationen innerhalb der Gene der

Interferon-Signatur bei Patienten mit DM finden, die in der Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung wahrscheinlich eine primäre Rolle spielen. Durch intensive Literaturrecherche konnten wir herausfinden, dass die Proteine der veränderten Gene wichtig für basale Zellfunktionen sind, wie Weiterleitung von Immunantworten, Erkennung von Antigenen und auch am Aufbau von Sarkomeren, dem kontraktile Element von Muskelzellen.

Eine Mutation stellt eine Änderung der genomischen Sequenz dar. Solche Änderungen können in einer veränderten Funktion der Proteine resultieren. Ein weiterer wichtiger Schritt in der Untersuchung von Mutationen ist daher die Analyse der Funktion einer Mutation. Je nachdem, ob es sich bei einer Mutation um eine Gain-of-Function (GOF) oder Loss-of-Function (LOF) Mutation handelt, kann ein Protein seine native Funktion verlieren oder eine neue Funktion erhalten (486-489). Im konkreten Fall der DM würde dies bedeuten, dass zum Beispiel nur eine GOF Mutation im Gen *IFI44L* die Krankheitsentstehung via der Interferon-Hypothese unterstützt, eine LOF Mutation könnte allerdings eine gesteigerte Interferon-Antwort nicht erklären. Dies bedeutet, dass die in dieser Arbeit gelieferten Daten einen ersten Schritt in einer Reihe weiterer noch notwendiger Untersuchungen darstellen - idealerweise mit einer größeren, unabhängigen Kohorte. Um eine konkrete Aussage zur Funktion der Mutation bei den hier gefundenen Genen treffen zu können sind weitere eingehende Untersuchungen nötig, welche den Umfang dieser Arbeit überschreiten. Daher haben wir zunächst von einer entsprechenden definitiveren Aussage abgesehen.

Zuletzt soll auch noch auf ein Detail eingegangen werden: in Zusammenschau aller Daten, die durch die Literaturrecherche gefunden wurden, tauchte ein Signalweg immer wieder auf: der PI3K/AKT Signalweg schien viele Verbindungen zu den Proteinen zu besitzen, die sich den bei den untersuchten Patienten entdeckten Mutationen zuordnen ließen. Insgesamt fand sich bei acht Genen ein Zusammenhang mit diesem Signalweg (*ANP32B*, *USF3*, *MET*, *SYTL1*, *PIK3C2G*, *PIK3C2B*, *PIK3C3*, *HRAS*). In manchen Fällen handelte es sich um direkte Interaktionspartner, in anderen Fällen zeigten sich indirekte Interaktionen, die über verschiedene Wege aber trotzdem in die Beeinflussung dieses Signalweges mündeten. Eine Überprüfung dieser Entdeckung könnte neue, weitreichende Erkenntnisse nach sich ziehen, die im klinischen Alltag von großer Bedeutung für das therapeutische Management von Patienten mit Dermatomyositis sein

können. Einen Signalweg als Ursache einer Krankheit zu identifizieren, bietet die Möglichkeit direkt, genau an diesem Punkt durch ein Therapeutikum die Erkrankung zu behandeln und damit Patienten möglichst wenigen unerwünschten Arzneimittelwirkungen auszusetzen. Derzeit werden PI3/AKT Inhibitoren bereits in der Therapie von Neoplasien eingesetzt. Eine Evaluation der genauen Bedeutung des PI3/AKT Signalwegs bei Patienten mit DM ist daher von äußerster Bedeutung, da die weiteren Untersuchungen und Einbeziehung einer größeren Kohorte einen interessanten Therapiekandidat bieten könnte.

5.4.1. Stärken und Schwächen der Studie

Die durch die Histologie gewonnen Erkenntnisse über die Eigenschaften der Muskelbiospien zeigten, dass die von uns gewählten Patienten eine repräsentative Kohorte bildeten, sowohl für DM an sich als auch für die AK Subgruppen Mi-2, TIF-1 γ und MDA5 (für die Qualitätskriterien zur Auswahl der Patienten siehe Abschnitt 2). Die geringe Anzahl der Gesamtkohorte lässt sich schlicht durch die sehr geringe Inzidenz von DM mit 10 Fällen pro 1 Million erklären (490). Daraus ergibt sich, dass das limitierte Patientenkollektiv zwar klein wirkt, allerdings für DM eine aussagekräftige Kohorte darstellt. Nichtsdestotrotz wäre es wünschenswert die hier vorgestellten Ergebnisse mit Erkenntnissen über Patienten mit anderen Autoantikörpern wie anti-Jo1, anti-NXP2 oder anti-SAE und auch mit Patienten einer juvenilen DM zu vervollständigen, beziehungsweise die Ergebnisse in einer unabhängigen Kohorte zu überprüfen.

Die Analyse des menschlichen Genoms durch WES stellt eine unvoreingenommene (sogenannte unsupervised) Methode dar, um genetische Grundlagen von Erkrankungen zu untersuchen und auf diesem Wege Pathomechanismen besser zu verstehen. Die hier dargestellten Daten der WES wurden aus den Skelettmuskelbiospien von Patienten gewonnen. Der Tatsache geschuldet, dass es sich bei vielen um ältere Biopsien handelte, war bei manchen Proben nicht mehr genug Gewebe verfügbar, um eine DNA-Extraktion durchzuführen beziehungsweise entsprach die gewonnene DNA nicht den notwendigen Qualitätskriterien (siehe Abschnitt 3.4.7) für eine WES Analyse. Daher konnten von der Gesamtkohorte (n=36) nur 18 Patienten in dieser Analyse des genetischen Materials eingeschlossen werden. Leider konnten von den insgesamt 18 eingesendeten Patientenproben am Schluss nur insgesamt 12 Proben analysiert werden. Eine histologische Untersuchung mit Analyse wurde jedoch bei allen Patienten durchgeführt.

Die Expression der Gene wurde bei 22 Patienten untersucht. Eine Gewinnung des genetischen Materials durch Blutentnahme würde eine gute Ergänzung für die WES darstellen, ist aufgrund des retrospektiven Charakters der aktuellen Studie aber leider ebenfalls nicht möglich gewesen. Zukünftig wäre es daher interessant, die generierten Daten in einer unabhängigen Kohorte zu validieren, die Fallzahlen zu erhöhen und gegebenenfalls prospektiv parallel Blut und Muskelgewebe zu analysieren.

Die Analyse von WES Daten stellt eine hochinteressante und sehr brauchbare jedoch auch teure Methode dar, um die Fragestellung dieser Arbeit zu beantworten, weil man die Möglichkeit zur Untersuchung der gesamten genetischen Information eines Patienten hat, und die erhaltenen Varianten sehr gut im Kontext mit Kopienanzahl und Vorkommen in der Allgemeinbevölkerung beurteilen kann. Die Untersuchung einer größeren, unabhängigen Kohorte aus Patienten sowohl mit adulter DM als auch juveniler DM beziehungsweise seltene vorkommenden Antikörpern würde die Aussagekraft, wie oben erwähnt, verbessern. Auch eine vergleichbare Untersuchung mit Blutproben von DM Patienten würde zu einem erheblichen Wissenszuwachs der hier dargelegten Studienergebnisse beitragen.

Verschiedene Optionen, mit denen die hier entdeckten Gene noch intensiver untersucht werden könnten, stehen zur Verfügung. In zukünftigen Arbeiten könnten zum Beispiel folgende Charakteristika der Gene noch evaluiert werden: der genaue Konservierungsgrad eines Genes bietet zum Beispiel die Möglichkeit, dessen Wichtigkeit für einen Organismus zu untersuchen. Ebenso ist die Untersuchung, ob die jeweiligen Proteine auch im Muskel generell exprimiert werden, in Zukunft wichtig. In der hier vorgestellten Studie wurde für die Kopienanzahl ein Cut-Off-Wert von >50 festgelegt. Doch es ist auch vorstellbar, dass Gene, die mit einer geringeren Kopienanzahl detektiert wurden, ebenso Einfluss auf die Entstehung von DM haben können.

Die Untersuchung von epigenetischen Veränderungen bei Patienten mit DM wäre eine weitere, sehr sinnvolle Möglichkeit, um die Ergebnisse dieser Studie zu vervollständigen. Denn die Tatsache, dass genetische Veränderungen in zu der IFN-Signatur zählenden Genen vorliegen, allerdings häufig auch in der Allgemeinbevölkerung anzutreffen waren, lässt vermuten, dass nicht das alleinige Vorhandensein dieser Veränderungen zur Entwicklung einer so seltenen Erkrankung wie DM führt. Umwelteinflüsse können über

Mechanismen, die als epigenetische Veränderungen bezeichnet werden, allerdings dazu führen, dass diese Genveränderungen einen wesentlichen Beitrag dazu, leisten an DM zu erkranken. Unter epigenetischen Veränderungen versteht man externe Modifikationen der DNA, die zu einer veränderten Expression von Genen führen (491). Diese sind reversibel und potenziell auch erblich, verändern aber nicht die DNA-Sequenz. Dazu zählen unter anderem Histon-Modifikationen oder DNA Methylierung (491). Epigenetische Veränderungen sind an der Regulierung einer Reihe von biologischen Vorgänge beteiligt, wie etwa Zellproliferation oder Differenzierung; darüber hinaus zeigen neuere Studien, dass dysregulierte, epigenetische Mechanismen an der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen beteiligt sind (492-495). DNA Hypomethylierungen zeigten sich in Lupus-T-Zellen und B-Zellen (496-498) und bei Patienten mit Psoriasis (498, 499) und RA (500, 501) kann eine aberrante DNA Methylierung beobachtet werden. Eine dysregulierte DNA Methylierung konnte auch bei Patienten mit Systemischer Sklerose nachgewiesen werden (491). Das Vorliegen von epigenetischen Veränderungen bei Patienten mit DM scheint also sehr wahrscheinlich und könnte womöglich erklären, weshalb es zu einer erhöhten Expression von PD1 und seinen Liganden kommt, eine primäre Mutation in diesen Genen aber nicht detektierbar ist.

5.4.2. Klinische Bedeutung und therapeutische Konsequenzen

Diese Doktorarbeit soll einen Beitrag dazu leisten, die Mechanismen der Krankheitsentstehung der Dermatomyositis zu verstehen um in Zukunft – bestenfalls - eine „maßgeschneiderte“ Therapie für Patienten entwickeln zu können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die Immuncheckpoint-Hypothese als auch die Interferonhypothese der Krankheitsentstehung der Dermatomyositis durch genetische Variablen untermauern lassen. Eine monogenetische Veränderung konnte erwartungsgemäß nicht gezeigt werden, dies vor dem Hintergrund, dass die Mehrzahl der Autoimmunerkrankungen eher auf polygenetischen Risikofaktoren basiert (502). Allerdings konnte durch eingehende Recherche dargelegt werden, dass einige der Mutationen, die bei den für diese Arbeit untersuchten Patienten entdeckt wurden, eine schlüssige Erklärung für den klinischen Phänotyp bieten, und deswegen auch in die Pathogenese der Dermatomyositis involviert sein können.

Um für Patienten jedweder Erkrankung eine zufriedenstellende Therapie zu entwickeln, ist es notwendig den Pathomechanismus derselben grundlegend zu verstehen. Nur dann ist es möglich, Medikamente zu entwickeln, die nicht nur die auftretenden Symptome lindern, sondern auch eine kausale Heilung erzielen.

Für die DM kann es sehr wichtig sein, genetische Mutationen und deren Zusammenhang mit der Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung zu verstehen: sollte sich nämlich zeigen, dass viele Moleküle, deren Gene mutiert sind, sich einem speziellen Signalweg zuordnen lassen, so könnte durch Inhibierung oder Aktivierung ebendieses Signalweges eine zielgerichtete Therapie für Patienten mit DM entwickelt werden. Im klinischen Alltag sind zielgerichtete Therapeutika bereits weit verbreitet und werden vielfach sehr erfolgreich in der Therapie von Krebserkrankungen und Autoimmunerkrankungen eingesetzt.

In Hinblick auf Autoimmunerkrankungen und sogenannten autoinflammatorischen Erkrankungen (auch monogenetische Erkrankungen), chronische, meist unheilbare Leiden, welche häufig mit Immunsuppressiva behandelt werden, sind diese Therapeutika von großer Bedeutung.

Patienten profitieren immens von einer zielgerichteten Therapie, die seltener jene starken unerwünschten Arzneimittelwirkungen aufweisen als dies eher breit wirksame Immunsuppressiva tun. Monoklonale Antikörper wirken als „targeted therapies“ indem sie gezielt Enzyme und Rezeptoren inhibieren oder aktivieren. Allerdings weisen auch diese eine Reihe an unerwünschten Arzneimittelwirkungen auf.

Deshalb muss an potentielle Therapeutika für die DM hohe Ansprüche gestellt werden und sie müssen - wie alle Therapeutika - verlässlich und effizient wirken, besser sein als die sogenannte „Standardtherapie“ und reproduzierbare Ergebnisse zeigen. Darüber hinaus muss ein klares Verständnis darüber herrschen, welche Funktionen dem Gen und vor allem dem Protein zukommen, das durch die Therapie verändert wird. Denn solange ein Mechanismus nicht klar verstanden wird, birgt es unabsehbare Risiken, in so ein fragiles System einzugreifen. Denn die Inhibierung oder Aktivierung eines Signalweges kann zwar auf der einen Seite die Pathophysiologie, die zu einer Erkrankung führt, unterbinden, andererseits aber auch zur Ausbildung einer anderen Erkrankung führen. Im konkreten Fall von PD1 gilt, dass das Eingreifen in diesen Signalweg zu einer vermehrten Entstehung von unerwünschter Immunphänomene kommen kann.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit könnten auch auf anderen Wegen das therapeutische und diagnostische Management von DM Patienten beeinflussen: möglicherweise könnten Assoziationen zwischen den hier entdeckten Mutationen und dem klinischen Phänotyp oder der Ausprägung der Erkrankung bestehen. Wie gezeigt werden konnte, gab es distinkte Unterschiede zwischen den Antikörper-Subgruppen, die unter Umständen auch die verschiedenen Symptome bei Patienten mit unterschiedlichen Antikörpern erklären. Auch ein Zusammenhang mit der Schwere der Ausprägung der DM-Symptome könnte bestehen, wodurch Proteine, welche durch diese Gene kodiert werden in Zukunft möglicherweise als Biomarker verwendet werden könnten. Auch dies erfordert selbstverständlich eine eingehende Überprüfung.

Die hier präsentierten Daten tragen dazu bei, den Pathomechanismus von DM besser zu verstehen. Diese Arbeit kann daher die Grundlage bilden ein besseres, gezieltes klinisches Management und therapeutisches Regime zu entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

1. Tansley SL, McHugh NJ, Wedderburn LR. Adult and juvenile dermatomyositis: are the distinct clinical features explained by our current understanding of serological subgroups and pathogenic mechanisms? *Arthritis Res Ther.* 2013;15(2):211.
2. Rider LG, Katz JD, Jones OY. Developments in the classification and treatment of the juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Rheum Dis Clin North Am.* 2013;39(4):877-904.
3. Khanna S, Reed AM. Immunopathogenesis of juvenile dermatomyositis. *Muscle Nerve.* 2010;41(5):581-92.
4. Olazagasti JM, Baez PJ, Wetter DA, Ernste FC. Cancer risk in dermatomyositis: a meta-analysis of cohort studies. *Am J Clin Dermatol.* 2015;16(2):89-98.
5. Selva-O'Callaghan A, Pinal-Fernandez I, Trallero-Araguas E, Millisenda JC, Grau-Junyent JM, Mammen AL. Classification and management of adult inflammatory myopathies. *Lancet Neurol.* 2018;17(9):816-28.
6. Benveniste O, Stenzel W, Allenbach Y. Advances in serological diagnostics of inflammatory myopathies. *Curr Opin Neurol.* 2016;29(5):662-73.
7. Best M, Jachiet M, Molinari N, Manna F, Girard C, Pallure V, Cosnes A, Lipsker D, Hubiche T, Schmutz JL, Le Corre Y, Cordel N, Dandurand M, Dereure O, Guillot B, Du-Thanh A, Bulai Livideanu C, Chasset F, Bouaziz JD, Frances C, Bengoufa D, Vincent T, Bessis D. Distinctive cutaneous and systemic features associated with specific antimyositis antibodies in adults with dermatomyositis: a prospective multicentric study of 117 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2018;32(7):1164-72.
8. Cruellas MG, Viana Vdos S, Levy-Neto M, Souza FH, Shinjo SK. Myositis-specific and myositis-associated autoantibody profiles and their clinical associations in a large series of patients with polymyositis and dermatomyositis. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68(7):909-14.
9. Wang HB, Zhang Y. Mi2, an auto-antigen for dermatomyositis, is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(12):2517-21.
10. Reichlin M, Mattioli M. Description of a serological reaction characteristic of polymyositis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1976;5(1):12-20.
11. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med.* 1975;292(8):403-7.
12. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med.* 1975;292(7):344-7.
13. Targoff IN, Reichlin M. The association between Mi-2 antibodies and dermatomyositis. *Arthritis Rheum.* 1985;28(7):796-803.
14. Pinal-Fernandez I, Mecoli CA, Casal-Dominguez M, Pak K, Hosono Y, Huapaya J, Huang W, Albayda J, Tiniakou E, Paik JJ, Johnson C, Danoff SK, Corse AM, Christopher-Stine L, Mammen AL. More prominent muscle involvement in patients with dermatomyositis with anti-Mi2 autoantibodies. *Neurology.* 2019.
15. Aggarwal R, Bandos A, Reed AM, Ascherman DP, Barohn RJ, Feldman BM, Miller FW, Rider LG, Harris-Love MO, Levesque MC, Oddis CV. Predictors of clinical improvement in rituximab-treated refractory adult and juvenile dermatomyositis and adult polymyositis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(3):740-9.
16. Hengstman GJ, Vree Egberts WT, Seelig HP, Lundberg IE, Moutsopoulos HM, Doria A, Mosca M, Vencovsky J, van Venrooij WJ, van Engelen BG. Clinical characteristics

- of patients with myositis and autoantibodies to different fragments of the Mi-2 beta antigen. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(2):242-5.
17. Petri MH, Satoh M, Martin-Marquez BT, Vargas-Ramirez R, Jara LJ, Saavedra MA, Cruz-Gonzalez C, Andrade-Ortega L, Vera-Lastra O, Salazar-Paramo M, Prieto-Parra RE, Gonzalez-Lopez L, Gamez-Nava JI, Ramirez-Sanchez HU, Chan JY, Ross SJ, Chan EK, Vazquez-Del Mercado M. Implications in the difference of anti-Mi-2 and -p155/140 autoantibody prevalence in two dermatomyositis cohorts from Mexico City and Guadalajara. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(2):R48.
 18. Targoff IN. Update on myositis-specific and myositis-associated autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol*. 2000;12(6):475-81.
 19. Targoff IN, Mamyrova G, Trieu EP, Perurena O, Koneru B, O'Hanlon TP, Miller FW, Rider LG, Childhood Myositis Heterogeneity Study G, International Myositis Collaborative Study G. A novel autoantibody to a 155-kd protein is associated with dermatomyositis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(11):3682-9.
 20. Satoh M, Tanaka S, Ceribelli A, Calise SJ, Chan EK. A Comprehensive Overview on Myositis-Specific Antibodies: New and Old Biomarkers in Idiopathic Inflammatory Myopathy. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;52(1):1-19.
 21. Fiorentino DF, Kuo K, Chung L, Zaba L, Li S, Casciola-Rosen L. Distinctive cutaneous and systemic features associated with antitranscriptional intermediary factor-1gamma antibodies in adults with dermatomyositis. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(3):449-55.
 22. 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 NK, Date H, Masuda N, Mikata T, Motoyoshi Y, Uesaka Y, Maeda MH, Nakashima R, Tsuji S, Kwak S, Mimori T, Shimizu J. Anti-TIF1-gamma antibody and cancer-associated myositis: A clinicohistopathologic study. *Neurology*. 2016;87(3):299-308.
 23. Allenbach Y, Benveniste O, Goebel HH, Stenzel W. Integrated classification of inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2017;43(1):62-81.
 24. Best M, Molinari N, Chasset F, Vincent T, Cordel N, Bessis D. Use of Anti-transcriptional Intermediary Factor-1 Gamma Autoantibody in Identifying Adult Dermatomyositis Patients with Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acta Derm Venereol*. 2019;99(3):256-62.
 25. Pinal-Fernandez I, Ferrer-Fabregas B, Trallero-Araguas E, Balada E, Martinez MA, Milisenda JC, Aparicio-Espanol G, Labrador-Horrillo M, Garcia-Patos V, Grau-Junyent JM, Selva-O'Callaghan A. Tumour TIF1 mutations and loss of heterozygosity related to cancer-associated myositis. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(2):388-96.
 26. Mukherjee K, Korithoski B, Kolaczowski B. Ancient origins of vertebrate-specific innate antiviral immunity. *Mol Biol Evol*. 2014;31(1):140-53.
 27. Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, Yukawa N, Yoshifuji H, Nojima T, Kawabata D, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Okawa K, Mimori T. The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen identified by the anti-CADM-140 antibody. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(3):433-40.
 28. Fiorentino D, Werth VP. Dermatomyositis autoantibodies: clinical markers of patients past, present, and future. *Arch Dermatol*. 2011;147(4):492-4.
 29. Hamaguchi Y, Kuwana M, Hoshino K, Hasegawa M, Kaji K, Matsushita T, Komura K, Nakamura M, Kodera M, Suga N, Higashi A, Ogusu K, Tsutsui K, Furusaki A, Tanabe H, Sasaoka S, Muro Y, Yoshikawa M, Ishiguro N, Ayano M, Muroi E, Fujikawa K, Umeda Y, Kawase M, Mabuchi E, Asano Y, Sodemoto K, Seishima M, Yamada H, Sato S, Takehara K, Fujimoto M. Clinical correlations with dermatomyositis-specific

- autoantibodies in adult Japanese patients with dermatomyositis: a multicenter cross-sectional study. *Arch Dermatol.* 2011;147(4):391-8.
30. Allenbach Y, Leroux G, Suarez-Calvet X, Preusse C, Gallardo E, Hervier B, Rigolet A, Hie M, Pehl D, Limal N, Hufnagl P, Zerbe N, Meyer A, Aouizerate J, Uzunhan Y, Maisonobe T, Goebel HH, Benveniste O, Stenzel W, French Myositis N. Dermatomyositis With or Without Anti-Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Antibodies: Common Interferon Signature but Distinct NOS2 Expression. *Am J Pathol.* 2016;186(3):691-700.
 31. Greenberg SA, Pinkus JL, Pinkus GS, Burleson T, Sanoudou D, Tawil R, Barohn RJ, Saperstein DS, Briemberg HR, Ericsson M, Park P, Amato AA. Interferon-alpha/beta-mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis. *Ann Neurol.* 2005;57(5):664-78.
 32. O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med.* 2015;66:311-28.
 33. Haller O, Kochs G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(1):79-87.
 34. Knight E, Jr. Antiviral and cell growth inhibitory activities reside in the same glycoprotein of human fibroblast interferon. *Nature.* 1976;262(5566):302-3.
 35. Suarez-Calvet X, Gallardo E, Nogales-Gadea G, Querol L, Navas M, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Illa I. Altered RIG-I/DDX58-mediated innate immunity in dermatomyositis. *J Pathol.* 2014;233(3):258-68.
 36. Salajegheh M, Kong SW, Pinkus JL, Walsh RJ, Liao A, Nazareno R, Amato AA, Krastins B, Morehouse C, Higgs BW, Jallal B, Yao Y, Sarracino DA, Parker KC, Greenberg SA. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) conjugates proteins in dermatomyositis muscle with perifascicular atrophy. *Ann Neurol.* 2010;67(1):53-63.
 37. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Derfoul A, Pak K, Plotz P, Miller FW, Milisenda JC, Grau-Junyent JM, Selva-O'Callaghan A, Paik J, Albayda J, Christopher-Stine L, Lloyd TE, Corse AM, Mammen AL. Identification of distinctive interferon gene signatures in different types of myositis. *Neurology.* 2019;93(12):e1193-e204.
 38. Greenberg SA. Proposed immunologic models of the inflammatory myopathies and potential therapeutic implications. *Neurology.* 2007;69(21):2008-19.
 39. Greenberg SA. A gene expression approach to study perturbed pathways in myositis. *Curr Opin Rheumatol.* 2007;19(6):536-41.
 40. Liao AP, Salajegheh M, Nazareno R, Kagan JC, Jubin RG, Greenberg SA. Interferon β is associated with type 1 interferon-inducible gene expression in dermatomyositis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(5):831-6.
 41. Niewold TB, Kariuki SN, Morgan GA, Shrestha S, Pachman LM. Elevated serum interferon-alpha activity in juvenile dermatomyositis: associations with disease activity at diagnosis and after thirty-six months of therapy. *Arthritis Rheum.* 2009;60(6):1815-24.
 42. Pestronk A, Schmidt RE, Choksi R. Vascular pathology in dermatomyositis and anatomic relations to myopathology. *Muscle Nerve.* 2010;42(1):53-61.
 43. Probst-Cousin S, Neundorfer B, Heuss D. Microvasculopathic neuromuscular diseases: lessons from hypoxia-inducible factors. *Neuromuscul Disord.* 2010;20(3):192-7.
 44. Preusse C, Allenbach Y, Hoffmann O, Goebel HH, Pehl D, Radke J, Doeser A, Schneider U, Alten RH, Kallinich T, Benveniste O, von Moers A, Schoser B, Schara U, Stenzel W. Differential roles of hypoxia and innate immunity in juvenile and adult dermatomyositis. *Acta Neuropathol Commun.* 2016;4(1):45.

45. Gitiaux C, Kostallari E, Lafuste P, Authier FJ, Christov C, Gherardi RK. Whole microvascular unit deletions in dermatomyositis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(3):445-52.
46. Cappelletti C, Baggi F, Zolezzi F, Biancolini D, Beretta O, Severa M, Coccia EM, Confalonieri P, Morandi L, Mora M, Mantegazza R, Bernasconi P. Type I interferon and Toll-like receptor expression characterizes inflammatory myopathies. *Neurology*. 2011;76(24):2079-88.
47. Feldman D, Hoar RM, Niemann WH, Valentine T, Cukierski M, Hendrickx AG. Tubuloreticular inclusions in placental chorionic villi of rhesus monkeys after maternal treatment with interferon. *Am J Obstet Gynecol*. 1986;155(2):413-24.
48. Greenberg SA. Dermatomyositis and type 1 interferons. *Curr Rheumatol Rep*. 2010;12(3):198-203.
49. Greenberg SA. Type 1 interferons and myositis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12 Suppl 1:S4.
50. Tezak Z, Hoffman EP, Lutz JL, Fedczyna TO, Stephan D, Bremer EG, Krasnoselska-Riz I, Kumar A, Pachman LM. Gene expression profiling in DQA1*0501+ children with untreated dermatomyositis: a novel model of pathogenesis. *J Immunol*. 2002;168(8):4154-63.
51. Greenberg SA, Sanoudou D, Haslett JN, Kohane IS, Kunkel LM, Beggs AH, Amato AA. Molecular profiles of inflammatory myopathies. *Neurology*. 2002;59(8):1170-82.
52. Walsh RJ, Kong SW, Yao Y, Jallal B, Kiener PA, Pinkus JL, Beggs AH, Amato AA, Greenberg SA. Type I interferon-inducible gene expression in blood is present and reflects disease activity in dermatomyositis and polymyositis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(11):3784-92.
53. Wong D, Kea B, Pesich R, Higgs BW, Zhu W, Brown P, Yao Y, Fiorentino D. Interferon and biologic signatures in dermatomyositis skin: specificity and heterogeneity across diseases. *PLoS One*. 2012;7(1):e29161.
54. Greenberg SA, Higgs BW, Morehouse C, Walsh RJ, Kong SW, Brohawn P, Zhu W, Amato A, Salajegheh M, White B, Kiener PA, Jallal B, Yao Y. Relationship between disease activity and type 1 interferon- and other cytokine-inducible gene expression in blood in dermatomyositis and polymyositis. *Genes Immun*. 2012;13(3):207-13.
55. Baechler EC, Bauer JW, Slattery CA, Ortmann WA, Espe KJ, Novitzke J, Ytterberg SR, Gregersen PK, Behrens TW, Reed AM. An interferon signature in the peripheral blood of dermatomyositis patients is associated with disease activity. *Mol Med*. 2007;13(1-2):59-68.
56. Huard C, Gulla SV, Bennett DV, Coyle AJ, Vleugels RA, Greenberg SA. Correlation of cutaneous disease activity with type 1 interferon gene signature and interferon beta in dermatomyositis. *Br J Dermatol*. 2017;176(5):1224-30.
57. Lopez de Padilla CM, Vallejo AN, McNallan KT, Vehe R, Smith SA, Dietz AB, Vuk-Pavlovic S, Reed AM. Plasmacytoid dendritic cells in inflamed muscle of patients with juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(5):1658-68.
58. Magro CM, Segal JP, Crowson AN, Chadwick P. The phenotypic profile of dermatomyositis and lupus erythematosus: a comparative analysis. *J Cutan Pathol*. 2010;37(6):659-71.
59. Wenzel J, Schmidt R, Proelss J, Zahn S, Bieber T, Tuting T. Type I interferon-associated skin recruitment of CXCR3+ lymphocytes in dermatomyositis. *Clin Exp Dermatol*. 2006;31(4):576-82.
60. McNiff JM, Kaplan DH. Plasmacytoid dendritic cells are present in cutaneous dermatomyositis lesions in a pattern distinct from lupus erythematosus. *J Cutan Pathol*. 2008;35(5):452-6.

61. Volpi S, Picco P, Caorsi R, Candotti F, Gattorno M. Type I interferonopathies in pediatric rheumatology. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2016;14(1):35.
62. Volkman HE, Stetson DB. The enemy within: endogenous retroelements and autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2014;15(5):415-22.
63. Kretschmer S, Lee-Kirsch MA. Type I interferon-mediated autoinflammation and autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2017;49:96-102.
64. Omarjee O, Picard C, Frachette C, Moreews M, Rieux-Laucat F, Soulas-Sprauel P, Viel S, Lega JC, Bader-Meunier B, Walzer T, Mathieu AL, Cimaz R, Belot A. Monogenic lupus: Dissecting heterogeneity. *Autoimmun Rev.* 2019;18(10):102361.
65. Davidson S, Steiner A, Harapas CR, Masters SL. An Update on Autoinflammatory Diseases: Interferonopathies. *Curr Rheumatol Rep.* 2018;20(7):38.
66. Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pasdar A, Sahebkar A. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol.* 2019;234(10):16824-37.
67. Nurieva RI, Liu X, Dong C. Molecular mechanisms of T-cell tolerance. *Immunol Rev.* 2011;241(1):133-44.
68. Huang C, Zhu HX, Yao Y, Bian ZH, Zheng YJ, Li L, Moutsopoulos HM, Gershwin ME, Lian ZX. Immune checkpoint molecules. Possible future therapeutic implications in autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2019;104:102333.
69. Wan YY, Flavell RA. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol.* 2009;1(1):20-36.
70. Zhang Q, Vignali DA. Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity. *Immunity.* 2016;44(5):1034-51.
71. Legat A, Speiser DE, Pircher H, Zehn D, Furtak SA. Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than "Exhaustion" of Human CD8 T Cells. *Front Immunol.* 2013;4:455.
72. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2010;236:219-42.
73. Momtaz P, Postow MA. Immunologic checkpoints in cancer therapy: focus on the programmed death-1 (PD-1) receptor pathway. *Pharmacogenomics Pers Med.* 2014;7:357-65.
74. Colli ML, Hill JLE, Marroquí L, Chaffey J, Dos Santos RS, Leete P, Coomans de Brachène A, Paula FMM, Op de Beeck A, Castela A, Marselli L, Krogvold L, Dahl-Jorgensen K, Marchetti P, Morgan NG, Richardson SJ, Eizirik DL. PDL1 is expressed in the islets of people with type 1 diabetes and is up-regulated by interferons- α and- γ via IRF1 induction. *EBioMedicine.* 2018;36:367-75.
75. Rui Y, Honjo T, Chikuma S. Programmed cell death 1 inhibits inflammatory helper T-cell development through controlling the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(40):16073-8.
76. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 1999;11(2):141-51.
77. Raptopoulou AP, Bertsias G, Makrygiannakis D, Verginis P, Kritikos I, Tzardi M, Klareskog L, Catrina AI, Sidiropoulos P, Boumpas DT. The programmed death 1/programmed death ligand 1 inhibitory pathway is up-regulated in rheumatoid synovium and regulates peripheral T cell responses in human and murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(7):1870-80.
78. Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, Honjo T, Morinobu A, Hatachi S, Shimatani K, Tanaka Y, Minato N, Kumagai S. Anti-programmed cell death 1 antibody reduces CD4+PD-1+

- T cells and relieves the lupus-like nephritis of NZB/W F1 mice. *J Immunol.* 2010;184(5):2337-47.
79. Zamani MR, Aslani S, Salmaninejad A, Javan MR, Rezaei N. PD-1/PD-L and autoimmunity: A growing relationship. *Cell Immunol.* 2016;310:27-41.
 80. Park SJ, Kim JH, Song MY, Sung YC, Lee SW, Park Y. PD-1 deficiency protects experimental colitis via alteration of gut microbiota. *BMB Rep.* 2017;50(11):578-83.
 81. Song MY, Hong CP, Park SJ, Kim JH, Yang BG, Park Y, Kim SW, Kim KS, Lee JY, Lee SW, Jang MH, Sung YC. Protective effects of Fc-fused PD-L1 on two different animal models of colitis. *Gut.* 2015;64(2):260-71.
 82. Matakı N, Kikuchi K, Kawai T, Higashiyama M, Okada Y, Kurihara C, Hokari R, Kawaguchi A, Nagao S, Kondo T, Itoh K, Miyakawa H, Miura S. Expression of PD-1, PD-L1, and PD-L2 in the liver in autoimmune liver diseases. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(2):302-12.
 83. Bartosińska J, Zakrzewska E, Raczkiwicz D, Purkot J, Michalak-Stoma A, Kowal M, Krasowska D, Chodorowska G, Giannopoulos K. Suppressed Programmed Death 1 Expression on CD4(+) and CD8(+) T Cells in Psoriatic Patients. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:5385102.
 84. Kim JH, Choi YJ, Lee BH, Song MY, Ban CY, Kim J, Park J, Kim SE, Kim TG, Park SH, Kim HP, Sung YC, Kim SC, Shin EC. Programmed cell death ligand 1 alleviates psoriatic inflammation by suppressing IL-17A production from programmed cell death 1-high T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(5):1466-76.e3.
 85. Zhou J, Jin JO, Kawai T, Yu Q. Endogenous programmed death ligand-1 restrains the development and onset of Sjögren's syndrome in non-obese diabetic mice. *Sci Rep.* 2016;6:39105.
 86. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science.* 2018;359(6382):1350-5.
 87. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252-64.
 88. Li X, Song W, Shao C, Shi Y, Han W. Emerging predictors of the response to the blockade of immune checkpoints in cancer therapy. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(1):28-39.
 89. Weber JS, Hodi FS, Wolchok JD, Topalian SL, Schadendorf D, Larkin J, Sznol M, Long GV, Li H, Waxman IM, Jiang J, Robert C. Safety Profile of Nivolumab Monotherapy: A Pooled Analysis of Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol.* 2017;35(7):785-92.
 90. Sibaud V, Meyer N, Lamant L, Vigarios E, Mazieres J, Delord JP. Dermatologic complications of anti-PD-1/PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Curr Opin Oncol.* 2016;28(4):254-63.
 91. Curry JL, Tetzlaff MT, Nagarajan P, Drucker C, Diab A, Hymes SR, Duvic M, Hwu WJ, Wargo JA, Torres-Cabala CA, Rapini RP, Prieto VG. Diverse types of dermatologic toxicities from immune checkpoint blockade therapy. *J Cutan Pathol.* 2017;44(2):158-76.
 92. Belum VR, Benhuri B, Postow MA, Hellmann MD, Lesokhin AM, Segal NH, Motzer RJ, Wu S, Busam KJ, Wolchok JD, Lacouture ME. Characterisation and management of dermatologic adverse events to agents targeting the PD-1 receptor. *Eur J Cancer.* 2016;60:12-25.
 93. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocha E, Savage KJ, Hernberg MM, Lebbé C, Charles J, Mihalciou C, Chiarion-Sileni V, Mauch C, Cognetti F, Arance A, Schmidt H, Schadendorf D, Gogas H, Lundgren-Eriksson L, Horak C, Sharkey B, Waxman IM,

- Atkinson V, Ascierto PA. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015;372(4):320-30.
94. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, Carlino MS, Haanen JB, Maio M, Marquez-Rodas I, McArthur GA, Ascierto PA, Long GV, Callahan MK, Postow MA, Grossmann K, Sznol M, Dreno B, Bastholt L, Yang A, Rollin LM, Horak C, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373(1):23-34.
95. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, Daud A, Carlino MS, McNeil C, Lotem M, Larkin J, Lorigan P, Neyns B, Blank CU, Hamid O, Mateus C, Shapira-Frommer R, Kosh M, Zhou H, Ibrahim N, Ebbinghaus S, Ribas A. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2521-32.
96. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon RA, Reed K, Burke MM, Caldwell A, Kronenberg SA, Agunwamba BU, Zhang X, Lowy I, Inzunza HD, Feely W, Horak CE, Hong Q, Korman AJ, Wigginton JM, Gupta A, Sznol M. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2013;369(2):122-33.
97. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, Linette GP, Meyer N, Giguere JK, Agarwala SS, Shaheen M, Ernstoff MS, Minor D, Salama AK, Taylor M, Ott PA, Rollin LM, Horak C, Gagnier P, Wolchok JD, Hodi FS. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2006-17.
98. Abdel-Wahab N, Shah M, Suarez-Almazor ME. Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade in Patients with Cancer: A Systematic Review of Case Reports. *PLoS One.* 2016;11(7):e0160221.
99. Liewluck T, Kao JC, Mauermann ML. PD-1 Inhibitor-associated Myopathies: Emerging Immune-mediated Myopathies. *J Immunother.* 2018;41(4):208-11.
100. Shirai T, Sano T, Kamijo F, Saito N, Miyake T, Kodaira M, Katoh N, Nishie K, Okuyama R, Uhara H. Acetylcholine receptor binding antibody-associated myasthenia gravis and rhabdomyolysis induced by nivolumab in a patient with melanoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2016;46(1):86-8.
101. Kimura T, Fukushima S, Miyashita A, Aoi J, Jinnin M, Kosaka T, Ando Y, Matsukawa M, Inoue H, Kiyotani K, Park JH, Nakamura Y, Ihn H. Myasthenic crisis and polymyositis induced by one dose of nivolumab. *Cancer Sci.* 2016;107(7):1055-8.
102. Yoshioka M, Kambe N, Yamamoto Y, Suehiro K, Matsue H. Case of respiratory discomfort due to myositis after administration of nivolumab. *J Dermatol.* 2015;42(10):1008-9.
103. Diamantopoulos PT, Tsatsou K, Benopoulou O, Anastasopoulou A, Gogas H. Inflammatory Myopathy and Axonal Neuropathy in a Patient With Melanoma Following Pembrolizumab Treatment. *J Immunother.* 2017;40(6):221-3.
104. Vallet H, Gaillet A, Weiss N, Vanhaecke C, Saheb S, Touitou V, Franck N, Kramkimel N, Borden A, Touat M, Ricard D, Verny M, Maisonobe T, Psimaras D. Pembrolizumab-induced necrotic myositis in a patient with metastatic melanoma. *Ann Oncol.* 2016;27(7):1352-3.
105. Haddox CL, Shenoy N, Shah KK, Kao JC, Jain S, Halfdanarson TR, Wijdicks EF, Goetz MP. Pembrolizumab induced bulbar myopathy and respiratory failure with necrotizing myositis of the diaphragm. *Ann Oncol.* 2017;28(3):673-5.

106. Larman HB, Salajegheh M, Nazareno R, Lam T, Sauld J, Steen H, Kong SW, Pinkus JL, Amato AA, Elledge SJ, Greenberg SA. Cytosolic 5'-nucleotidase 1A autoimmunity in sporadic inclusion body myositis. *Ann Neurol*. 2013;73(3):408-18.
107. Behling J, Kaes J, Münzel T, Grabbe S, Loquai C. New-onset third-degree atrioventricular block because of autoimmune-induced myositis under treatment with anti-programmed cell death-1 (nivolumab) for metastatic melanoma. *Melanoma Res*. 2017;27(2):155-8.
108. Sheik Ali S, Goddard AL, Luke JJ, Donahue H, Todd DJ, Werchniak A, Vleugels RA. Drug-associated dermatomyositis following ipilimumab therapy: a novel immune-mediated adverse event associated with cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 blockade. *JAMA Dermatol*. 2015;151(2):195-9.
109. Yamaguchi Y, Abe R, Haga N, Shimizu H. A case of drug-associated dermatomyositis following ipilimumab therapy. *Eur J Dermatol*. 2016;26(3):320-1.
110. Knauss S, Preusse C, Allenbach Y, Leonard-Louis S, Touat M, Fischer N, Radbruch H, Mothes R, Matyash V, Bohmerle W, Endres M, Goebel HH, Benveniste O, Stenzel W. PD1 pathway in immune-mediated myopathies: Pathogenesis of dysfunctional T cells revisited. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2019;6(3):e558.
111. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):486-99.
112. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009;114(8):1537-44.
113. Touat M, Maisonobe T, Knauss S, Ben Hadj Salem O, Hervier B, Auré K, Szwebel TA, Kramkimel N, Lethrosne C, Bruch JF, Laly P, Cadranet J, Weiss N, Béhin A, Allenbach Y, Benveniste O, Lenglet T, Psimaras D, Stenzel W, Léonard-Louis S. Immune checkpoint inhibitor-related myositis and myocarditis in patients with cancer. *Neurology*. 2018;91(10):e985-e94.
114. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods*. 2014;11(4):361-2.
115. Hombach D, Schuelke M, Knierim E, Ehmke N, Schwarz JM, Fischer-Zirnsak B, Seelow D. MutationDistiller: user-driven identification of pathogenic DNA variants. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(W1):W114-W20.
116. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Stein TI, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary D, Warshawsky D, Guan-Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, Lancet D. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2016;54(1):1.30.1-1..3.
117. Knierim E, Gill E, Seifert F, Morales-Gonzalez S, Unudurthi SD, Hund TJ, Stenzel W, Schuelke M. A recessive mutation in beta-IV-spectrin (SPTBN4) associates with congenital myopathy, neuropathy, and central deafness. *Hum Genet*. 2017;136(7):903-10.
118. Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M. Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures. *Am J Hum Genet*. 2016;98(3):473-89.

119. Schottmann G, Seelow D, Seifert F, Morales-Gonzalez S, Gill E, von Au K, von Moers A, Stenzel W, Schuelke M. Recessive REEP1 mutation is associated with congenital axonal neuropathy and diaphragmatic palsy. *Neurol Genet.* 2015;1(4):e32.
120. Suarez-Calvet X, Gallardo E, Pinal-Fernandez I, De Luna N, Lleixa C, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Castellvi I, Martinez MA, Grau JM, Selva-O'Callaghan A, Illa I. RIG-I expression in perifascicular myofibers is a reliable biomarker of dermatomyositis. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):174.
121. Wolstencroft PW, Fiorentino DF. Dermatomyositis Clinical and Pathological Phenotypes Associated with Myositis-Specific Autoantibodies. *Curr Rheumatol Rep.* 2018;20(5):28.
122. Vuillard C, Pineton de Chambrun M, de Prost N, Guérin C, Schmidt M, Dargent A, Quenot JP, Préau S, Ledoux G, Neuville M, Voiriot G, Fartoukh M, Coudroy R, Dumas G, Maury E, Terzi N, Tandjaoui-Lambiotte Y, Schneider F, Grall M, Guérot E, Larcher R, Ricome S, Le Mao R, Colin G, Guitton C, Zafrani L, Morawiec E, Dubert M, Pajot O, Mentec H, Plantefève G, Contou D. Clinical features and outcome of patients with acute respiratory failure revealing anti-synthetase or anti-MDA-5 dermato-pulmonary syndrome: a French multicenter retrospective study. *Ann Intensive Care.* 2018;8(1):87.
123. Romero-Bueno F, Diaz Del Campo P, Trallero-Araguás E, Ruiz-Rodríguez JC, Castellvi I, Rodriguez-Nieto MJ, Martínez-Becerra MJ, Sanchez-Pernaute O, Pinal-Fernandez I, Solanich X, Gono T, Gonzalez-Gay MA, Plana MN, Selva-O'Callaghan A. Recommendations for the treatment of anti-melanoma differentiation-associated gene 5-positive dermatomyositis-associated rapidly progressive interstitial lung disease. *Semin Arthritis Rheum.* 2020;50(4):776-90.
124. Cobos GA, Femia A, Vleugels RA. Dermatomyositis: An Update on Diagnosis and Treatment. *Am J Clin Dermatol.* 2020;21(3):339-53.
125. van de Vlekkert J, Hoogendijk JE, de Haan RJ, Algra A, van der Tweel I, van der Pol WL, Uijtendaal EV, de Visser M. Oral dexamethasone pulse therapy versus daily prednisolone in sub-acute onset myositis, a randomised clinical trial. *Neuromuscul Disord.* 2010;20(6):382-9.
126. Karaiskos D, Mavragani CP, Makaroni S, Zinzaras E, Voulgarelis M, Rabavilas A, Moutsopoulos HM. Stress, coping strategies and social support in patients with primary Sjögren's syndrome prior to disease onset: a retrospective case-control study. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(1):40-6.
127. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V, Gregersen PK, Behrens TW. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2610-5.
128. Banchereau R, Hong S, Cantarel B, Baldwin N, Baisch J, Edens M, Cepika AM, Acs P, Turner J, Anguiano E, Vinod P, Khan S, Obermoser G, Blankenship D, Wakeland E, Nassi L, Gotte A, Punaro M, Liu YJ, Banchereau J, Rossello-Urgell J, Wright T, Pascual V. Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell.* 2016;165(6):1548-50.
129. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, Pascual V. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med.* 2003;197(6):711-23.
130. Lyons PA, McKinney EF, Rayner TF, Hatton A, Woffendin HB, Koukoulaki M, Freeman TC, Jayne DR, Chaudhry AN, Smith KG. Novel expression signatures

- identified by transcriptional analysis of separated leucocyte subsets in systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(6):1208-13.
131. Nakou M, Knowlton N, Frank MB, Bertias G, Osban J, Sandel CE, Papadaki H, Raptopoulou A, Sidiropoulos P, Kritikos I, Tassioulas I, Centola M, Boumpas DT. Gene expression in systemic lupus erythematosus: bone marrow analysis differentiates active from inactive disease and reveals apoptosis and granulopoiesis signatures. *Arthritis Rheum.* 2008;58(11):3541-9.
 132. Panousis NI, Bertias GK, Ongen H, Gergianaki I, Tektonidou MG, Trachana M, Romano-Palumbo L, Bielser D, Howald C, Pamfil C, Fanouriakis A, Kosmara D, Repa A, Sidiropoulos P, Dermizakis ET, Boumpas DT. Combined genetic and transcriptome analysis of patients with SLE: distinct, targetable signatures for susceptibility and severity. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(8):1079-89.
 133. Wette SG, Smith HK, Lamb GD, Murphy RM. Characterization of muscle ankyrin repeat proteins in human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2017;313(3):C327-c39.
 134. Kojic S, Radojkovic D, Faulkner G. Muscle ankyrin repeat proteins: their role in striated muscle function in health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2011;48(5-6):269-94.
 135. Miller MK, Bang ML, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K, Granzier H, McElhinny AS, Gregorio CC, Labeit S. The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol.* 2003;333(5):951-64.
 136. Nakada C, Oka A, Nonaka I, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M. Cardiac ankyrin repeat protein is preferentially induced in atrophic myofibers of congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathology International.* 2003;53(10):653-8.
 137. Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A, Nonaka I, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M. Altered Expression of ARPP Protein in Skeletal Muscles of Patients with Muscular Dystrophy, Congenital Myopathy and Spinal Muscular Atrophy. *Pathobiology.* 2004;71(1):43-51.
 138. Liu R, Jin JP. Calponin isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: Regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non-muscle cells. *Gene.* 2016;585(1):143-53.
 139. Abe M, Takahashi K, Hiwada K. Effect of calponin on actin-activated myosin ATPase activity. *J Biochem.* 1990;108(5):835-8.
 140. Winder SJ, Walsh MP. Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 1990;265(17):10148-55.
 141. Winder SJ, Walsh MP, Vasulka C, Johnson JD. Calponin-calmodulin interaction: properties and effects on smooth and skeletal muscle actin binding and actomyosin ATPases. *Biochemistry.* 1993;32(48):13327-33.
 142. Hossain MM, Hwang DY, Huang QQ, Sasaki Y, Jin JP. Developmentally regulated expression of calponin isoforms and the effect of h2-calponin on cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284(1):C156-67.
 143. Fukui Y, Masuda H, Takagi M, Takahashi K, Kiyokane K. The presence of h2-calponin in human keratinocyte. *J Dermatol Sci.* 1997;14(1):29-36.
 144. Tang J, Hu G, Hanai J, Yadlapalli G, Lin Y, Zhang B, Galloway J, Bahary N, Sinha S, Thisse B, Thisse C, Jin JP, Zon LI, Sukhatme VP. A critical role for calponin 2 in vascular development. *J Biol Chem.* 2006;281(10):6664-72.

145. Hossain MM, Crish JF, Eckert RL, Lin JJ, Jin JP. h2-Calponin is regulated by mechanical tension and modifies the function of actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 2005;280(51):42442-53.
146. Huang QQ, Hossain MM, Wu K, Parai K, Pope RM, Jin JP. Role of H2-calponin in regulating macrophage motility and phagocytosis. *J Biol Chem.* 2008;283(38):25887-99.
147. Huang QQ, Birkett R, Koessler RE, Cuda CM, Haines GK, 3rd, Jin JP, Perlman H, Pope RM. Fas signaling in macrophages promotes chronicity in K/BxN serum-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(1):68-77.
148. Huang QQ, Hossain MM, Sun W, Xing L, Pope RM, Jin JP. Deletion of calponin 2 in macrophages attenuates the severity of inflammatory arthritis in mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016;311(4):C673-c85.
149. Szekanecz Z, Koch AE. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2007;19(3):289-95.
150. Li Y, Lee PY, Reeves WH. Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2010;58(5):355-64.
151. Paino IM, Miranda JC, Marzocchi-Machado CM, Cesarino EJ, de Castro FA, de Souza AM. Phagocytosis and nitric oxide levels in rheumatic inflammatory states in elderly women. *J Clin Lab Anal.* 2011;25(1):47-51.
152. Tas SW, Quartier P, Botto M, Fossati-Jimack L. Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(2):216-21.
153. Birnbaum J, Hoke A, Lalji A, Calabresi P, Bhargava P, Casciola-Rosen L. Brief Report: Anti-Calponin 3 Autoantibodies: A Newly Identified Specificity in Patients With Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2018;70(10):1610-6.
154. Radke J, Koll R, Preuße C, Pehl D, Todorova K, Schönemann C, Allenbach Y, Aronica E, de Visser M, Heppner FL, Weis J, Doostkam S, Maisonobe T, Benveniste O, Goebel HH, Stenzel W. Architectural B-cell organization in skeletal muscle identifies subtypes of dermatomyositis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2018;5(3):e451.
155. Grewal PK, Todd LC, van der Maarel S, Frants RR, Hewitt JE. FRG1, a gene in the FSH muscular dystrophy region on human chromosome 4q35, is highly conserved in vertebrates and invertebrates. *Gene.* 1998;216(1):13-9.
156. Hanel ML, Wuebbles RD, Jones PL. Muscular dystrophy candidate gene FRG1 is critical for muscle development. *Dev Dyn.* 2009;238(6):1502-12.
157. Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* 2002;12(8):1231-45.
158. van Koningsbruggen S, Dirks RW, Mommaas AM, Onderwater JJ, Deidda G, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. FRG1P is localised in the nucleolus, Cajal bodies, and speckles. *J Med Genet.* 2004;41(4):e46.
159. Gabellini D, Green MR, Tupler R. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell.* 2002;110(3):339-48.
160. Gabellini D, D'Antona G, Moggio M, Prella A, Zecca C, Adami R, Angeletti B, Ciscato P, Pellegrino MA, Bottinelli R, Green MR, Tupler R. Facioscapulohumeral muscular dystrophy in mice overexpressing FRG1. *Nature.* 2006;439(7079):973-7.

161. van Koningsbruggen S, Straasheijm KR, Sterrenburg E, de Graaf N, Dauwerse HG, Frants RR, van der Maarel SM. FRG1P-mediated aggregation of proteins involved in pre-mRNA processing. *Chromosoma*. 2007;116(1):53-64.
162. Liu Q, Jones TI, Tang VW, Briehner WM, Jones PL. Facioscapulohumeral muscular dystrophy region gene-1 (FRG-1) is an actin-bundling protein associated with muscle-attachment sites. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 7):1116-23.
163. Lecroisey C, Ségalat L, Gieseler K. The *C. elegans* dense body: anchoring and signaling structure of the muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2007;28(1):79-87.
164. Nahabedian JF, Qadota H, Stirman JN, Lu H, Benian GM. Bending amplitude - a new quantitative assay of *C. elegans* locomotion: identification of phenotypes for mutants in genes encoding muscle focal adhesion components. *Methods*. 2012;56(1):95-102.
165. Ferri G, Huichalaf CH, Caccia R, Gabellini D. Direct interplay between two candidate genes in FSHD muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2015;24(5):1256-66.
166. Aithal A, Rauth S, Kshirsagar P, Shah A, Lakshmanan I, Junker WM, Jain M, Ponnusamy MP, Batra SK. MUC16 as a novel target for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(8):675-86.
167. Haridas D, Ponnusamy MP, Chugh S, Lakshmanan I, Seshacharyulu P, Batra SK. MUC16: molecular analysis and its functional implications in benign and malignant conditions. *Faseb j*. 2014;28(10):4183-99.
168. Marcos-Silva L, Narimatsu Y, Halim A, Campos D, Yang Z, Tarp MA, Pereira PJ, Mandel U, Bennett EP, Vakhrushev SY, Lavery SB, David L, Clausen H. Characterization of binding epitopes of CA125 monoclonal antibodies. *J Proteome Res*. 2014;13(7):3349-59.
169. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Menon BB. Comparison of the transmembrane mucins MUC1 and MUC16 in epithelial barrier function. *PLoS One*. 2014;9(6):e100393.
170. Govindarajan B, Gipson IK. Membrane-tethered mucins have multiple functions on the ocular surface. *Exp Eye Res*. 2010;90(6):655-63.
171. Seelenmeyer C, Wegehingel S, Lechner J, Nickel W. The cancer antigen CA125 represents a novel counter receptor for galectin-1. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 7):1305-18.
172. Argüeso P, Guzman-Aranguez A, Mantelli F, Cao Z, Ricciuto J, Panjwani N. Association of cell surface mucins with galectin-3 contributes to the ocular surface epithelial barrier. *J Biol Chem*. 2009;284(34):23037-45.
173. Taniguchi T, Woodward AM, Magnelli P, McColgan NM, Lehoux S, Jacobo SMP, Mauris J, Argüeso P. N-Glycosylation affects the stability and barrier function of the MUC16 mucin. *J Biol Chem*. 2017;292(26):11079-90.
174. Haridas D, Chakraborty S, Ponnusamy MP, Lakshmanan I, Rachagani S, Cruz E, Kumar S, Das S, Lele SM, Anderson JM, Wittel UA, Hollingsworth MA, Batra SK. Pathobiological implications of MUC16 expression in pancreatic cancer. *PLoS One*. 2011;6(10):e26839.
175. Lakshmanan I, Salfity S, Seshacharyulu P, Rachagani S, Thomas A, Das S, Majhi PD, Nimmakayala RK, Vengoji R, Lele SM, Ponnusamy MP, Batra SK, Ganti AK. MUC16 Regulates TSPYL5 for Lung Cancer Cell Growth and Chemoresistance by Suppressing p53. *Clin Cancer Res*. 2017;23(14):3906-17.
176. Lakshmanan I, Ponnusamy MP, Das S, Chakraborty S, Haridas D, Mukhopadhyay P, Lele SM, Batra SK. MUC16 induced rapid G2/M transition via interactions with

- JAK2 for increased proliferation and anti-apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*. 2012;31(7):805-17.
177. Tyler C, Kapur A, Felder M, Belisle JA, Trautman C, Gubbels JA, Connor JP, Patankar MS. The mucin MUC16 (CA125) binds to NK cells and monocytes from peripheral blood of women with healthy pregnancy and preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2012;68(1):28-37.
178. Hüffmeier U, Lascorz J, Becker T, Schürmeier-Horst F, Magener A, Ekici AB, Ende S, Thiel CT, Thoma-Uszynski S, Mössner R, Reich K, Kurrat W, Wienker TF, Traupe H, Reis A. Characterisation of psoriasis susceptibility locus 6 (PSORS6) in patients with early onset psoriasis and evidence for interaction with PSORS1. *J Med Genet*. 2009;46(11):736-44.
179. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhardt AH, Targan SR, Xavier RJ, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghorji J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008;40(8):955-62.
180. Chen SH, Hung WC, Wang P, Paul C, Konstantopoulos K. Mesothelin binding to CA125/MUC16 promotes pancreatic cancer cell motility and invasion via MMP-7 activation. *Sci Rep*. 2013;3:1870.
181. Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, Minami S, Umesaki N, Takeuchi M, Miyajima A. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem*. 2004;279(10):9190-8.
182. Gubbels JA, Belisle J, Onda M, Rancourt C, Migneault M, Ho M, Bera TK, Connor J, Sathyanarayana BK, Lee B, Pastan I, Patankar MS. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Mol Cancer*. 2006;5(1):50.
183. Marsit CJ, Okpukpara C, Danaee H, Kelsey KT. Epigenetic silencing of the PRSS3 putative tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog*. 2005;44(2):146-50.
184. Jiang G, Cao F, Ren G, Gao D, Bhakta V, Zhang Y, Cao H, Dong Z, Zang W, Zhang S, Wong HH, Hiley C, Crnogorac-Jurcevic T, Lemoine NR, Wang Y. PRSS3 promotes tumour growth and metastasis of human pancreatic cancer. *Gut*. 2010;59(11):1535-44.
185. Hockla A, Miller E, Salameh MA, Copland JA, Radisky DC, Radisky ES. PRSS3/mesotrypsin is a therapeutic target for metastatic prostate cancer. *Mol Cancer Res*. 2012;10(12):1555-66.
186. Diederichs S, Bulk E, Steffen B, Ji P, Tickenbrock L, Lang K, Zänker KS, Metzger R, Schneider PM, Gerke V, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2004;64(16):5564-9.
187. Hockla A, Radisky DC, Radisky ES. Mesotrypsin promotes malignant growth of breast cancer cells through shedding of CD109. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;124(1):27-38.

188. Ma R, Ye X, Cheng H, Ma Y, Cui H, Chang X. PRSS3 expression is associated with tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2015;137(3):546-52.
189. Han S, Lee CW, Trevino JG, Hughes SJ, Sarosi GA, Jr. Autocrine extra-pancreatic trypsin 3 secretion promotes cell proliferation and survival in esophageal adenocarcinoma. *PLoS One.* 2013;8(10):e76667.
190. Qian L, Gao X, Huang H, Lu S, Cai Y, Hua Y, Liu Y, Zhang J. PRSS3 is a prognostic marker in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncotarget.* 2017;8(13):21444-53.
191. Rinderknecht H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci.* 1986;31(3):314-21.
192. Salameh MA, Radisky ES. Biochemical and structural insights into mesotrypsin: an unusual human trypsin. *Int J Biochem Mol Biol.* 2013;4(3):129-39.
193. Bitoun E, Chavanas S, Irvine AD, Lonie L, Bodemer C, Paradisi M, Hamel-Teillac D, Ansai S, Mitsushashi Y, Taieb A, de Prost Y, Zambruno G, Harper JI, Hovnanian A. Netherton syndrome: disease expression and spectrum of SPINK5 mutations in 21 families. *J Invest Dermatol.* 2002;118(2):352-61.
194. Carrell RW, Lomas DA. Alpha1-antitrypsin deficiency--a model for conformational diseases. *N Engl J Med.* 2002;346(1):45-53.
195. Király O, Boulling A, Witt H, Le Maréchal C, Chen JM, Rosendahl J, Battaggia C, Wartmann T, Sahin-Tóth M, Férec C. Signal peptide variants that impair secretion of pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) cause autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Hum Mutat.* 2007;28(5):469-76.
196. Lomas DA, Belorgey D, Mallya M, Onda M, Kinghorn KJ, Sharp LK, Phillips RL, Page R, Crowther DC, Miranda E. Polymerisation underlies alpha1-antitrypsin deficiency, dementia and other serpinopathies. *Front Biosci.* 2004;9:2873-91.
197. Lomas DA, Mahadeva R. Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest.* 2002;110(11):1585-90.
198. Sun Z, Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol.* 2004;5(3):182-90.
199. Nakanishi J, Yamamoto M, Koyama J, Sato J, Hibino T. Keratinocytes synthesize enteropeptidase and multiple forms of trypsinogen during terminal differentiation. *J Invest Dermatol.* 2010;130(4):944-52.
200. Miyai M, Matsumoto Y, Yamanishi H, Yamamoto-Tanaka M, Tsuboi R, Hibino T. Keratinocyte-specific mesotrypsin contributes to the desquamation process via kallikrein activation and LEKTI degradation. *J Invest Dermatol.* 2014;134(6):1665-74.
201. Bandesh K, Bharadwaj D. Genetic variants entail type 2 diabetes as an innate immune disorder. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2020;1868(9):140458.
202. Ghilardi C, Silini A, Figini S, Anastasia A, Lupi M, Fruscio R, Giavazzi R, Bani MR. Trypsinogen 4 boosts tumor endothelial cells migration through proteolysis of tissue factor pathway inhibitor-2. *Oncotarget.* 2015;6(29):28389-400.
203. Sugiyama K, Kawaguchi A, Okuwaki M, Nagata K. pp32 and APRIL are host cell-derived regulators of influenza virus RNA synthesis from cRNA. *Elife.* 2015;4.
204. Munemasa Y, Suzuki T, Aizawa K, Miyamoto S, Imai Y, Matsumura T, Horikoshi M, Nagai R. Promoter region-specific histone incorporation by the novel histone

- chaperone ANP32B and DNA-binding factor KLF5. *Mol Cell Biol.* 2008;28(3):1171-81.
205. Tochio N, Umehara T, Munemasa Y, Suzuki T, Sato S, Tsuda K, Koshihara S, Kigawa T, Nagai R, Yokoyama S. Solution structure of histone chaperone ANP32B: interaction with core histones H3-H4 through its acidic concave domain. *J Mol Biol.* 2010;401(1):97-114.
206. Mutai H, Toyoshima Y, Sun W, Hattori N, Tanaka S, Shiota K. PAL31, a novel nuclear protein, expressed in the developing brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;274(2):427-33.
207. Sun W, Hattori N, Mutai H, Toyoshima Y, Kimura H, Tanaka S, Shiota K. PAL31, a nuclear protein required for progression to the S phase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(4):1048-54.
208. Seo SB, McNamara P, Heo S, Turner A, Lane WS, Chakravarti D. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell.* 2001;104(1):119-30.
209. Yu Y, Shen SM, Zhang FF, Wu ZX, Han B, Wang LS. Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B (ANP32B) contributes to retinoic acid-induced differentiation of leukemic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423(4):721-5.
210. Shen SM, Yu Y, Wu YL, Cheng JK, Wang LS, Chen GQ. Downregulation of ANP32B, a novel substrate of caspase-3, enhances caspase-3 activation and apoptosis induction in myeloid leukemic cells. *Carcinogenesis.* 2010;31(3):419-26.
211. Sun W, Kimura H, Hattori N, Tanaka S, Matsuyama S, Shiota K. Proliferation related acidic leucine-rich protein PAL31 functions as a caspase-3 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342(3):817-23.
212. Reilly PT, Afzal S, Gorrini C, Lui K, Bukhman YV, Wakeham A, Haight J, Ling TW, Cheung CC, Elia AJ, Turner PV, Mak TW. Acidic nuclear phosphoprotein 32kDa (ANP32)B-deficient mouse reveals a hierarchy of ANP32 importance in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(25):10243-8.
213. Chemnitz J, Pieper D, Stich L, Schumacher U, Balabanov S, Spohn M, Grundhoff A, Steinkasserer A, Hauber J, Zinser E. The acidic protein rich in leucines Anp32b is an immunomodulator of inflammation in mice. *Sci Rep.* 2019;9(1):4853.
214. Yang S, Zhou L, Reilly PT, Shen SM, He P, Zhu XN, Li CX, Wang LS, Mak TW, Chen GQ, Yu Y. ANP32B deficiency impairs proliferation and suppresses tumor progression by regulating AKT phosphorylation. *Cell Death Dis.* 2016;7(2):e2082.
215. Abend M, Azizova T, Müller K, Dörr H, Doucha-Senf S, Kreppel H, Rusinova G, Glazkova I, Vyazovskaya N, Unger K, Braselmann H, Meineke V. Association of radiation-induced genes with noncancer chronic diseases in Mayak workers occupationally exposed to prolonged radiation. *Radiat Res.* 2015;183(3):249-61.
216. Becker BV, Richter C, Ullmann R, Beinke C, Majewski M, Exner V, Weisel G, Abend M, Port M. Exploring the Link between Radiation Exposure and Multifocal Basal Cell Carcinomas in a Former Chernobyl Clean-up Worker by Combining Different Molecular Biological Techniques. *Radiat Res.* 2017;188(5):571-8.
217. Jia W, Feng YI, Sanders AJ, Davies EL, Jiang WG. Phosphoinositide-3-Kinase Enhancers, PIKEs: Their Biological Functions and Roles in Cancer. *Anticancer Res.* 2016;36(3):1103-9.
218. Riddick N, Ohtani K, Surks HK. Targeting by myosin phosphatase-RhoA interacting protein mediates RhoA/ROCK regulation of myosin phosphatase. *J Cell Biochem.* 2008;103(4):1158-70.

219. Lee JH, Palaia T, Ragolia L. Impaired insulin-stimulated myosin phosphatase Rho-interacting protein signaling in diabetic Goto-Kakizaki vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;302(9):C1371-81.
220. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, Mahale S, Davies KD, Aisner DL, Pilling AB, Berge EM, Kim J, Sasaki H, Park S, Kryukov G, Garraway LA, Hammerman PS, Haas J, Andrews SW, Lipson D, Stephens PJ, Miller VA, Varella-Garcia M, Jänne PA, Doebele RC. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med.* 2013;19(11):1469-72.
221. Fang W, Gan J, Hong S, Lu F, Zhang L. MPRIP-ALK, a Novel ALK Rearrangement That Responds to ALK Inhibition in NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2019;14(7):e148-e51.
222. Naumann N, Schwaab J, Metzgeroth G, Jawhar M, Haferlach C, Göhring G, Schlegelberger B, Dietz CT, Schnittger S, Lotfi S, Gärtner M, Dang TA, Hofmann WK, Cross NC, Reiter A, Fabarius A. Fusion of PDGFRB to MPRIP, CPSF6, and GOLGB1 in three patients with eosinophilia-associated myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer.* 2015;54(12):762-70.
223. Falco M, Amabile S, Acquaviva F. RAI1 gene mutations: mechanisms of Smith-Magenis syndrome. *Appl Clin Genet.* 2017;10:85-94.
224. Poisson A, Nicolas A, Bousquet I, Raverot V, Gronfier C, Demily C. Smith-Magenis Syndrome: Molecular Basis of a Genetic-Driven Melatonin Circadian Secretion Disorder. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14).
225. Toulouse A, Rochefort D, Roussel J, Joobert R, Rouleau GA. Molecular cloning and characterization of human RAI1, a gene associated with schizophrenia. *Genomics.* 2003;82(2):162-71.
226. Fragoso YD, Stoney PN, Shearer KD, Sementilli A, Nanesco SE, Sementilli P, McCaffery P. Expression in the human brain of retinoic acid induced 1, a protein associated with neurobehavioural disorders. *Brain Struct Funct.* 2015;220(2):1195-203.
227. Williams SR, Zies D, Mullegama SV, Grotewiel MS, Elsea SH. Smith-Magenis syndrome results in disruption of CLOCK gene transcription and reveals an integral role for RAI1 in the maintenance of circadian rhythmicity. *Am J Hum Genet.* 2012;90(6):941-9.
228. Huang WH, Guenther CJ, Xu J, Nguyen T, Schwarz LA, Wilkinson AW, Gozani O, Chang HY, Shamloo M, Luo L. Molecular and Neural Functions of Rai1, the Causal Gene for Smith-Magenis Syndrome. *Neuron.* 2016;92(2):392-406.
229. Girirajan S, Truong HT, Blanchard CL, Elsea SH. A functional network module for Smith-Magenis syndrome. *Clin Genet.* 2009;75(4):364-74.
230. Thaker VV, Esteves KM, Towne MC, Brownstein CA, James PM, Crowley L, Hirschhorn JN, Elsea SH, Beggs AH, Picker J, Agrawal PB. Whole exome sequencing identifies RAI1 mutation in a morbidly obese child diagnosed with ROHHAD syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(5):1723-30.
231. Li C, Enomoto M, Rossi AM, Seo MD, Rahman T, Stathopoulos PB, Taylor CW, Ikura M, Ames JB. CaBP1, a neuronal Ca²⁺ sensor protein, inhibits inositol trisphosphate receptors by clamping intersubunit interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(21):8507-12.
232. Haynes LP, McCue HV, Burgoyne RD. Evolution and functional diversity of the Calcium Binding Proteins (CaBPs). *Front Mol Neurosci.* 2012;5:9.
233. Yang T, Britt JK, Cintrón-Pérez CJ, Vázquez-Rosa E, Tobin KV, Stalker G, Hardie J, Taugher RJ, Wemmie J, Pieper AA, Lee A. Ca(2+)-Binding Protein 1 Regulates Hippocampal-dependent Memory and Synaptic Plasticity. *Neuroscience.* 2018;380:90-102.

234. Zhang Y, Xu J, Zhu X. A 63 signature genes prediction system is effective for glioblastoma prognosis. *Int J Mol Med*. 2018;41(4):2070-8.
235. Li L, Liu X, Ma X, Deng X, Ji T, Hu P, Wan R, Qiu H, Cui D, Gao L. Identification of key candidate genes and pathways in glioblastoma by integrated bioinformatical analysis. *Exp Ther Med*. 2019;18(5):3439-49.
236. Tang N, Lin T, Yang J, Foskett JK, Ostap EM. CIB1 and CaBP1 bind to the myo1c regulatory domain. *J Muscle Res Cell Motil*. 2007;28(6):285-91.
237. Oates EC, Jones KJ, Donkervoort S, Charlton A, Brammah S, Smith JE, 3rd, Ware JS, Yau KS, Swanson LC, Whiffin N, Peduto AJ, Bournazos A, Waddell LB, Farrar MA, Sampaio HA, Teoh HL, Lamont PJ, Mowat D, Fitzsimons RB, Corbett AJ, Ryan MM, O'Grady GL, Sandaradura SA, Ghaoui R, Joshi H, Marshall JL, Nolan MA, Kaur S, Punetha J, Töpf A, Harris E, Bakshi M, Genetti CA, Marttila M, Werlauff U, Streichenberger N, Pestronk A, Mazanti I, Pinner JR, Vuillerot C, Grosman C, Camacho A, Mohassel P, Leach ME, Foley AR, Bharucha-Goebel D, Collins J, Connolly AM, Gilbreath HR, Iannaccone ST, Castro D, Cummings BB, Webster RI, Lazaro L, Vissing J, Coppens S, Deconinck N, Luk HM, Thomas NH, Foulds NC, Illingworth MA, Ellard S, McLean CA, Phadke R, Ravenscroft G, Witting N, Hackman P, Richard I, Cooper ST, Kamsteeg EJ, Hoffman EP, Bushby K, Straub V, Udd B, Ferreira A, North KN, Clarke NF, Lek M, Beggs AH, Bönnemann CG, MacArthur DG, Granzier H, Davis MR, Laing NG. Congenital Titinopathy: Comprehensive characterization and pathogenic insights. *Ann Neurol*. 2018;83(6):1105-24.
238. Gupta AR, Westphal A, Yang DYJ, Sullivan CAW, Eilbott J, Zaidi S, Voos A, Vander Wyk BC, Ventola P, Waqar Z, Fernandez TV, Ercan-Sencicek AG, Walker MF, Choi M, Schneider A, Hedderly T, Baird G, Friedman H, Cordeaux C, Ristow A, Shic F, Volkmar FR, Pelphrey KA. Neurogenetic analysis of childhood disintegrative disorder. *Mol Autism*. 2017;8:19.
239. Wang Y, Ye W, Liu Y, Mei B, Liu X, Huang Q. Osteoporosis genome-wide association study variant c.3781 C>A is regulated by a novel anti-osteogenic factor miR-345-5p. *Hum Mutat*. 2020;41(3):709-18.
240. Ni Y, Seballos S, Fletcher B, Romigh T, Yehia L, Mester J, Senter L, Niazi F, Saji M, Ringel MD, LaFramboise T, Eng C. Germline compound heterozygous polyglutamine deletion in USF3 may be involved in predisposition to heritable and sporadic epithelial thyroid carcinoma. *Hum Mol Genet*. 2017;26(2):243-57.
241. Abeyrathna P, Su Y. The critical role of Akt in cardiovascular function. *Vascul Pharmacol*. 2015;74:38-48.
242. Calera MR, Pilch PF. Induction of Akt-2 correlates with differentiation in Sol8 muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;251(3):835-41.
243. McFarlane C, Kelvin AA, de la Vega M, Govender U, Scott CJ, Burrows JF, Johnston JA. The deubiquitinating enzyme USP17 is highly expressed in tumor biopsies, is cell cycle regulated, and is required for G1-S progression. *Cancer Res*. 2010;70(8):3329-39.
244. McCann AP, Smyth P, Cogo F, McDaid WJ, Jiang L, Lin J, Evergren E, Burden RE, Van Schaeybroeck S, Scott CJ, Burrows JF. USP17 is required for trafficking and oncogenic signaling of mutant EGFR in NSCLC cells. *Cell Commun Signal*. 2018;16(1):77.
245. Shin JM, Yoo KJ, Kim MS, Kim D, Baek KH. Hyaluronan- and RNA-binding deubiquitinating enzymes of USP17 family members associated with cell viability. *BMC Genomics*. 2006;7:292.

246. Chen X, Wang C, Liao K, Zhou S, Cao L, Chen J, Xu C, Lin Y. USP17 Suppresses Tumorigenesis and Tumor Growth through Deubiquitinating AEP. *Int J Biol Sci.* 2019;15(4):738-48.
247. Fukuura K, Inoue Y, Miyajima C, Watanabe S, Tokugawa M, Morishita D, Ohoka N, Komada M, Hayashi H. The ubiquitin-specific protease USP17 prevents cellular senescence by stabilizing the methyltransferase SET8 and transcriptionally repressing p21. *J Biol Chem.* 2019;294(44):16429-39.
248. Ducker C, Chow LKY, Saxton J, Handwerker J, McGregor A, Strahl T, Layfield R, Shaw PE. De-ubiquitination of ELK-1 by USP17 potentiates mitogenic gene expression and cell proliferation. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(9):4495-508.
249. Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, Lugli E, Lynn RC, Philip M, Rao A, Restifo NP, Schietinger A, Schumacher TN, Schwartzberg PL, Sharpe AH, Speiser DE, Wherry EJ, Youngblood BA, Zehn D. Defining 'T cell exhaustion'. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(11):665-74.
250. Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(3):309-14.
251. Menke J, Lucas JA, Zeller GC, Keir ME, Huang XR, Tsuboi N, Mayadas TN, Lan HY, Sharpe AH, Kelley VR. Programmed death 1 ligand (PD-L) 1 and PD-L2 limit autoimmune kidney disease: distinct roles. *J Immunol.* 2007;179(11):7466-77.
252. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, Sharpe AH. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol.* 2003;33(10):2706-16.
253. Luo Q, Huang Z, Ye J, Deng Y, Fang L, Li X, Guo Y, Jiang H, Ju B, Huang Q, Li J. PD-L1-expressing neutrophils as a novel indicator to assess disease activity and severity of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:47.
254. Benveniste O, Goebel HH, Stenzel W. Biomarkers in Inflammatory Myopathies-An Expanded Definition. *Front Neurol.* 2019;10:554.
255. Howell WM. HLA and disease: guilt by association. *Int J Immunogenet.* 2014;41(1):1-12.
256. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell.* 2017;170(4):605-35.
257. Pompura SL, Dominguez-Villar M. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function. *J Leukoc Biol.* 2018.
258. Fruman DA. Regulatory subunits of class IA PI3K. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;346:225-44.
259. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002;296(5573):1655-7.
260. Sanidas I, Polytarchou C, Hatziapostolou M, Ezell SA, Kottakis F, Hu L, Guo A, Xie J, Comb MJ, Iliopoulos D, Tsihchlis PN. Phosphoproteomics screen reveals akt isoform-specific signals linking RNA processing to lung cancer. *Mol Cell.* 2014;53(4):577-90.
261. Damoulakis G, Gambardella L, Rossman KL, Lawson CD, Anderson KE, Fukui Y, Welch HC, Der CJ, Stephens LR, Hawkins PT. P-Rex1 directly activates RhoG to regulate GPCR-driven Rac signalling and actin polarity in neutrophils. *J Cell Sci.* 2014;127(Pt 11):2589-600.
262. Kulkarni S, Sitaru C, Jakus Z, Anderson KE, Damoulakis G, Davidson K, Hirose M, Juss J, Oxley D, Chessa TA, Ramadani F, Guillou H, Segonds-Pichon A, Fritsch A, Jarvis GE, Okkenhaug K, Ludwig R, Zillikens D, Mocsai A, Vanhaesebroeck B, Stephens LR, Hawkins PT. PI3K β plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes. *Sci Signal.* 2011;4(168):ra23.

263. Ramadani F, Bolland DJ, Garcon F, Emery JL, Vanhaesebroeck B, Corcoran AE, Okkenhaug K. The PI3K isoforms p110alpha and p110delta are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development. *Sci Signal*. 2010;3(134):ra60.
264. Sander S, Chu VT, Yasuda T, Franklin A, Graf R, Calado DP, Li S, Imami K, Selbach M, Di Virgilio M, Bullinger L, Rajewsky K. PI3 Kinase and FOXO1 Transcription Factor Activity Differentially Control B Cells in the Germinal Center Light and Dark Zones. *Immunity*. 2015;43(6):1075-86.
265. Kaneda MM, Cappello P, Nguyen AV, Ralainirina N, Hardamon CR, Foubert P, Schmid MC, Sun P, Mose E, Bouvet M, Lowy AM, Valasek MA, Sasik R, Novelli F, Hirsch E, Varner JA. Macrophage PI3K γ Drives Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression. *Cancer Discov*. 2016;6(8):870-85.
266. Costa-Mattioli M, Sonenberg N. RAPPING production of type I interferon in pDCs through mTOR. *Nat Immunol*. 2008;9(10):1097-9.
267. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood*. 2005;105(12):4743-8.
268. Crellin NK, Garcia RV, Levings MK. Altered activation of AKT is required for the suppressive function of human CD4+CD25+ T regulatory cells. *Blood*. 2007;109(5):2014-22.
269. Marshall NA, Galvin KC, Corcoran AM, Boon L, Higgs R, Mills KH. Immunotherapy with PI3K inhibitor and Toll-like receptor agonist induces IFN- γ +IL-17+ polyfunctional T cells that mediate rejection of murine tumors. *Cancer Res*. 2012;72(3):581-91.
270. Rodríguez-Borlado L, Barber DF, Hernández C, Rodríguez-Marcos MA, Sánchez A, Hirsch E, Wymann M, Martínez AC, Carrera AC. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the CD4/CD8 T cell differentiation ratio. *J Immunol*. 2003;170(9):4475-82.
271. Sauer S, Bruno L, Hertweck A, Finlay D, Leleu M, Spivakov M, Knight ZA, Cobb BS, Cantrell D, O'Connor E, Shokat KM, Fisher AG, Merckenschlager M. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(22):7797-802.
272. Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, McCubrey JA. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget*. 2010;1(2):89-103.
273. Bertacchini J, Heidari N, Mediani L, Capitani S, Shahjehani M, Ahmadzadeh A, Saki N. Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(12):2337-47.
274. Jouali F, Marchoudi N, Talbi S, Bilal B, El Khasmi M, Rhaissi H, Fekkak J. Detection of PI3K/AKT pathway in Moroccan population with triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):900.
275. Xia P, Xu XY. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. *Am J Cancer Res*. 2015;5(5):1602-9.
276. Li A, Chen H, Lin M, Zhang C, Tang E, Peng J, Wei Q, Li H, Yin L. PIK3C2G copy number is associated with clinical outcomes of colorectal cancer patients treated with oxaliplatin. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(1):1137-43.
277. Zhang M, Zhang X. The role of PI3K/AKT/FOXO signaling in psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2019;311(2):83-91.
278. Malemud CJ. The PI3K/Akt/PTEN/mTOR pathway: a fruitful target for inducing cell death in rheumatoid arthritis? *Future Med Chem*. 2015;7(9):1137-47.
279. Beşliu AN, Pistol G, Marica CM, Bănică LM, Chiţonu C, Ionescu R, Tănăseanu C, Tamsulea I, Matache C, Stefănescu M. PI3K/Akt signaling in peripheral T

- lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 2009;68(2):69-79.
280. Chen H, Shi B, Feng X, Kong W, Chen W, Geng L, Chen J, Liu R, Li X, Chen W, Gao X, Sun L. Leptin and Neutrophil-Activating Peptide 2 Promote Mesenchymal Stem Cell Senescence Through Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(9):2383-93.
281. Yang G, Song W, Postoak JL, Chen J, Martinez J, Zhang J, Wu L, Van Kaer L. Autophagy-related protein PIK3C3/VPS34 controls T cell metabolism and function. *Autophagy.* 2020:1-12.
282. Kariuki SN, Franek BS, Mikolaitis RA, Utset TO, Jolly M, Skol AD, Niewold TB. Promoter variant of PIK3C3 is associated with autoimmunity against Ro and Sm epitopes in African-American lupus patients. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:826434.
283. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, Qiu Y, Jussif JM, Carter LL, Wood CR, Chaudhary D. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett.* 2004;574(1-3):37-41.
284. Xu Y, Shen J, Ran Z. Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases. *Autophagy.* 2020;16(1):3-17.
285. Tal MC, Sasai M, Lee HK, Yordy B, Shadel GS, Iwasaki A. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(8):2770-5.
286. Perl A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(11):674-86.
287. Caza TN, Fernandez DR, Talaber G, Oaks Z, Haas M, Madaio MP, Lai ZW, Miklossy G, Singh RR, Chudakov DM, Malorni W, Middleton F, Banki K, Perl A. HRES-1/Rab4-mediated depletion of Drp1 impairs mitochondrial homeostasis and represents a target for treatment in SLE. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(10):1888-97.
288. Caielli S, Athale S, Domic B, Murat E, Chandra M, Banchereau R, Baisch J, Phelps K, Clayton S, Gong M, Wright T, Punaro M, Palucka K, Guiducci C, Banchereau J, Pascual V. Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in human lupus. *J Exp Med.* 2016;213(5):697-713.
289. Konig MF, Andrade F. A Critical Reappraisal of Neutrophil Extracellular Traps and NETosis Mimics Based on Differential Requirements for Protein Citrullination. *Front Immunol.* 2016;7:461.
290. Li S, Balmain A, Counter CM. A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(12):767-77.
291. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(11):828-51.
292. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(7):517-31.
293. Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1177-95.
294. Johnson DS, Chen YH. Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12(4):458-63.
295. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, Porta-Pardo E, Gao GF, Plaisier CL, Eddy JA, Ziv E, Culhane AC, Paull EO, Sivakumar IKA, Gentles AJ, Malhotra R, Farshidfar F, Colaprico A, Parker JS, Mose LE, Vo NS, Liu J, Liu Y, Rader J, Dhankani V, Reynolds SM, Bowlby R, Califano A, Cherniack AD,

- Anastassiou D, Bedognetti D, Mokrab Y, Newman AM, Rao A, Chen K, Krasnitz A, Hu H, Malta TM, Noushmehr H, Pedomallu CS, Bullman S, Ojesina AI, Lamb A, Zhou W, Shen H, Choueiri TK, Weinstein JN, Guinney J, Saltz J, Holt RA, Rabkin CS, Lazar AJ, Serody JS, Demicco EG, Disis ML, Vincent BG, Shmulevich I. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity*. 2018;48(4):812-30.e14.
296. Santra T, Herrero A, Rodriguez J, von Kriegsheim A, Iglesias-Martinez LF, Schwarzl T, Higgins D, Aye TT, Heck AJR, Calvo F, Agudo-Ibáñez L, Crespo P, Matallanas D, Kolch W. An Integrated Global Analysis of Compartmentalized HRAS Signaling. *Cell Rep*. 2019;26(11):3100-15.e7.
297. Khan AA, Soloski MJ, Sharp AH, Schilling G, Sabatini DM, Li SH, Ross CA, Snyder SH. Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Science*. 1996;273(5274):503-7.
298. Blackshaw S, Sawa A, Sharp AH, Ross CA, Snyder SH, Khan AA. Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates cell death. *Faseb j*. 2000;14(10):1375-9.
299. Hanson CJ, Bootman MD, Roderick HL. Cell signalling: IP3 receptors channel calcium into cell death. *Curr Biol*. 2004;14(21):R933-5.
300. Mendes CC, Gomes DA, Thompson M, Souto NC, Goes TS, Goes AM, Rodrigues MA, Gomez MV, Nathanson MH, Leite MF. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca²⁺ signals into mitochondria. *J Biol Chem*. 2005;280(49):40892-900.
301. Mangla A, Guerra MT, Nathanson MH. Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: A calcium channel for all seasons. *Cell Calcium*. 2020;85:102132.
302. Jang SI, Tandon M, Teos L, Zheng C, Warner BM, Alevizos I. Dual function of miR-1248 links interferon induction and calcium signaling defects in Sjögren's syndrome. *EBioMedicine*. 2019;48:526-38.
303. Huang YC, Lin YJ, Chang JS, Chen SY, Wan L, Sheu JJ, Lai CH, Lin CW, Liu SP, Chen CP, Tsai FJ. Single nucleotide polymorphism rs2229634 in the ITPR3 gene is associated with the risk of developing coronary artery aneurysm in children with Kawasaki disease. *Int J Immunogenet*. 2010;37(6):439-43.
304. Oishi T, Iida A, Otsubo S, Kamatani Y, Usami M, Takei T, Uchida K, Tsuchiya K, Saito S, Ohnisi Y, Tokunaga K, Nitta K, Kawaguchi Y, Kamatani N, Kochi Y, Shimane K, Yamamoto K, Nakamura Y, Yumura W, Matsuda K. A functional SNP in the NKX2.5-binding site of ITPR3 promoter is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese population. *J Hum Genet*. 2008;53(2):151-62.
305. Mariño E, Grey ST. B cells as effectors and regulators of autoimmunity. *Autoimmunity*. 2012;45(5):377-87.
306. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Magro CM, St Clair EW, Tedder TF. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2008;223:284-99.
307. Hemon P, Renaudineau Y, Debant M, Le Goux N, Mukherjee S, Brooks W, Mignen O. Calcium Signaling: From Normal B Cell Development to Tolerance Breakdown and Autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;53(2):141-65.
308. Li J, He Y, Hao J, Ni L, Dong C. High Levels of Eomes Promote Exhaustion of Antitumor CD8(+) T Cells. *Front Immunol*. 2018;9:2981.
309. Zhang J, Marotel M, Fauteux-Daniel S, Mathieu AL, Viel S, Marçais A, Walzer T. Tbet and Eomes govern differentiation and function of mouse and human NK cells and ILC1. *Eur J Immunol*. 2018;48(5):738-50.

310. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(2):214-21.
311. Šahmatova L, Sūgis E, Šunina M, Hermann H, Prans E, Pihlap M, Abram K, Rebane A, Peterson H, Peterson P, Kingo K, Kisand K. Signs of innate immune activation and premature immunosenescence in psoriasis patients. *Sci Rep.* 2017;7(1):7553.
312. Liu M, Liu J, Hao S, Wu P, Zhang X, Xiao Y, Jiang G, Huang X. Higher activation of the interferon-gamma signaling pathway in systemic lupus erythematosus patients with a high type I IFN score: relation to disease activity. *Clin Rheumatol.* 2018;37(10):2675-84.
313. Parnell GP, Gatt PN, Krupa M, Nickles D, McKay FC, Schibeci SD, Batten M, Baranzini S, Henderson A, Barnett M, Slee M, Vucic S, Stewart GJ, Booth DR. The autoimmune disease-associated transcription factors EOMES and TBX21 are dysregulated in multiple sclerosis and define a molecular subtype of disease. *Clin Immunol.* 2014;151(1):16-24.
314. Terao C, Raychaudhuri S, Gregersen PK. Recent Advances in Defining the Genetic Basis of Rheumatoid Arthritis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2016;17:273-301.
315. van Hamburg JP, Tas SW. Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2018;87:69-81.
316. Chen S, Zhang J, Liu QB, Zhuang JC, Wu L, Xu YF, Li HF, Wu ZY, Xiao BG. Variant of EOMES Associated with Increasing Risk in Chinese Patients with Relapsing-remitting Multiple Sclerosis. *Chin Med J (Engl).* 2018;131(6):643-7.
317. Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, Mullen AC, Gasink CR, Kaech SM, Miller JD, Gapin L, Ryan K, Russ AP, Lindsten T, Orange JS, Goldrath AW, Ahmed R, Reiner SL. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1236-44.
318. Intlekofer AM, Banerjee A, Takemoto N, Gordon SM, Dejong CS, Shin H, Hunter CA, Wherry EJ, Lindsten T, Reiner SL. Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science.* 2008;321(5887):408-11.
319. Paley MA, Kroy DC, Odorizzi PM, Johnnidis JB, Dolfi DV, Barnett BE, Bikoff EK, Robertson EJ, Lauer GM, Reiner SL, Wherry EJ. Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science.* 2012;338(6111):1220-5.
320. Jackson SR, Yuan J, Berrien-Elliott MM, Chen CL, Meyer JM, Donlin MJ, Teague RM. Inflammation programs self-reactive CD8+ T cells to acquire T-box-mediated effector function but does not prevent deletional tolerance. *J Leukoc Biol.* 2014;96(3):397-410.
321. Terayama K, Oka S, Seiki T, Miki Y, Nakamura A, Kozutsumi Y, Takio K, Kawasaki T. Cloning and functional expression of a novel glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the carbohydrate epitope HNK-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(12):6093-8.
322. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood.* 2003;101(7):2711-20.
323. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology.* 2011;134(1):17-32.

324. Le Priol Y, Puthier D, Lécureuil C, Combadière C, Debré P, Nguyen C, Combadière B. High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8+ CD57+ cells in HIV-infected and uninfected individuals. *J Immunol.* 2006;177(8):5145-54.
325. Palmer BE, Blyveis N, Fontenot AP, Wilson CC. Functional and phenotypic characterization of CD57+CD4+ T cells and their association with HIV-1-induced T cell dysfunction. *J Immunol.* 2005;175(12):8415-23.
326. Akbar AN, Henson SM. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):289-95.
327. Greenberg SA, Pinkus JL, Amato AA, Kristensen T, Dorfman DM. Association of inclusion body myositis with T cell large granular lymphocytic leukaemia. *Brain.* 2016;139(Pt 5):1348-60.
328. Nielsen CM, White MJ, Goodier MR, Riley EM. Functional Significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease. *Front Immunol.* 2013;4:422.
329. Greenberg SA, Amato AA. Uncertainties in the pathogenesis of adult dermatomyositis. *Curr Opin Neurol.* 2004;17(3):359-64.
330. Feldman D, Goldstein AL, Cox DC, Grimley PM. Cultured human endothelial cells treated with recombinant leukocyte A interferon. Tubuloreticular inclusion formation, antiproliferative effect, and 2',5' oligoadenylate synthetase induction. *Lab Invest.* 1988;58(5):584-9.
331. Indraccolo S, Pfeffer U, Minuzzo S, Esposito G, Roni V, Mandruzzato S, Ferrari N, Anfosso L, Dell'Eva R, Noonan DM, Chieco-Bianchi L, Albini A, Amadori A. Identification of genes selectively regulated by IFNs in endothelial cells. *J Immunol.* 2007;178(2):1122-35.
332. Indraccolo S. Interferon-alpha as angiogenesis inhibitor: learning from tumor models. *Autoimmunity.* 2010;43(3):244-7.
333. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(4):273-86.
334. Crow MK. Interferon-alpha: a new target for therapy in systemic lupus erythematosus? *Arthritis Rheum.* 2003;48(9):2396-401.
335. Rönnblom L, Alm GV. A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus. *J Exp Med.* 2001;194(12):F59-63.
336. Crow MK. Interferon-alpha: a therapeutic target in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010;36(1):173-86, x.
337. Fiorentino DF. Type I interferon in the induction or exacerbation of dermatomyositis: what this observation tells us about the naturally occurring disease. *Arch Dermatol.* 2008;144(10):1379-82.
338. Båve U, Nordmark G, Lövgren T, Rönnelid J, Cajander S, Eloranta ML, Alm GV, Rönnblom L. Activation of the type I interferon system in primary Sjögren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum.* 2005;52(4):1185-95.
339. Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, Jacques S, Ba N, Ittah M, Lepajolec C, Labetoulle M, Ardizzone M, Sibilía J, Fournier C, Chiochia G, Mariette X. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(8):2770-5.
340. Emamian ES, Leon JM, Lessard CJ, Grandits M, Baechler EC, Gaffney PM, Segal B, Rhodus NL, Moser KL. Peripheral blood gene expression profiling in Sjögren's syndrome. *Genes Immun.* 2009;10(4):285-96.

341. van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Voskuyl AE, Rustenburg F, Baggen JM, Ibrahim SM, Fero M, Dijkmans BA, Tak PP, Verweij CL. Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(8):1008-14.
342. van der Pouw Kraan TC, van Baarsen LG, Wijbrandts CA, Voskuyl AE, Rustenburg F, Baggen JM, Dijkmans BA, Tak PP, Verweij CL. Expression of a pathogen-response program in peripheral blood cells defines a subgroup of rheumatoid arthritis patients. *Genes Immun.* 2008;9(1):16-22.
343. van Baarsen LG, Bos WH, Rustenburg F, van der Pouw Kraan TC, Wolbink GJ, Dijkmans BA, van Schaardenburg D, Verweij CL. Gene expression profiling in autoantibody-positive patients with arthralgia predicts development of arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(3):694-704.
344. Conigliaro P, Perricone C, Benson RA, Garside P, Brewer JM, Perricone R, Valesini G. The type I IFN system in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity.* 2010;43(3):220-5.
345. Kim D, Peck A, Santer D, Patole P, Schwartz SM, Molitor JA, Arnett FC, Elkon KB. Induction of interferon-alpha by scleroderma sera containing autoantibodies to topoisomerase I: association of higher interferon-alpha activity with lung fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(7):2163-73.
346. Coelho LF, de Oliveira JG, Kroon EG. Interferons and scleroderma-a new clue to understanding the pathogenesis of scleroderma? *Immunol Lett.* 2008;118(2):110-5.
347. Bilgic H, Ytterberg SR, Amin S, McNallan KT, Wilson JC, Koeuth T, Ellingson S, Newman B, Bauer JW, Peterson EJ, Baechler EC, Reed AM. Interleukin-6 and type I interferon-regulated genes and chemokines mark disease activity in dermatomyositis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(11):3436-46.
348. Zhang J, Liu X, Meng Y, Wu H, Wu Y, Yang B, Wang L. Autoimmune disease associated IFIH1 single nucleotide polymorphism related with IL-18 serum levels in Chinese systemic lupus erythematosus patients. *Sci Rep.* 2018;8(1):9442.
349. Almine JF, O'Hare CAJ, Dunphy G, Haga IR, Naik RJ, Atrih A, Connolly DJ, Taylor J, Kelsall IR, Bowie AG, Beard PM, Unterholzner L. IFI16 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes. *Nature Communications.* 2017;8(1):14392.
350. Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity.* 2013;38(5):855-69.
351. Dawson MJ, Trapani JA. IFI 16 gene encodes a nuclear protein whose expression is induced by interferons in human myeloid leukaemia cell lines. *Journal of Cellular Biochemistry.* 1995;57(1):39-51.
352. Kerur N, Veetil Mohanan V, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P, Chandran B. IFI16 Acts as a Nuclear Pathogen Sensor to Induce the Inflammasome in Response to Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Cell Host & Microbe.* 2011;9(5):363-75.
353. Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS, Fitzgerald KA, Paludan SR, Bowie AG. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature Immunology.* 2010;11(11):997-1004.
354. Unterholzner L. The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors? *Immunobiology.* 2013;218(11):1312-21.
355. Dunphy G, Flannery SM, Almine JF, Connolly DJ, Paulus C, Jønsson KL, Jakobsen MR, Nevels MM, Bowie AG, Unterholzner L. Non-canonical Activation of the DNA

- Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF- κ B Signaling after Nuclear DNA Damage. *Molecular Cell*. 2018;71(5):745-60.e5.
356. Ansari MA, Dutta S, Veettil MV, Dutta D, Iqbal J, Kumar B, Roy A, Chikoti L, Singh VV, Chandran B. Herpesvirus Genome Recognition Induced Acetylation of Nuclear IFI16 Is Essential for Its Cytoplasmic Translocation, Inflammasome and IFN- β Responses. *PLOS Pathogens*. 2015;11(7):e1005019.
357. Caneparo V, Cena T, De Andrea M, Dell'oste V, Stratta P, Quaglia M, Tincani A, Andreoli L, Ceffa S, Taraborelli M, Magnani C, Landolfo S, Gariglio M. Anti-IFI16 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2013;22(6):607-13.
358. Baer AN, Petri M, Sohn J, Rosen A, Casciola-Rosen L. Association of Antibodies to Interferon-Inducible Protein-16 With Markers of More Severe Disease in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2016;68(2):254-60.
359. De Andrea M, De Santis M, Caneparo V, Generali E, Sirotti S, Isailovic N, Guidelli GM, Ceribelli A, Fabbroni M, Simpatico A, Cantarini L, Gisondi P, Idolazzi L, Gariglio M, Selmi C. Serum IFI16 and anti-IFI16 antibodies in psoriatic arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2020;199(1):88-96.
360. Alunno A, Caneparo V, Bistoni O, Caterbi S, Terenzi R, Gariglio M, Bartoloni E, Manzo A, Landolfo S, Gerli R. Circulating Interferon-Inducible Protein IFI16 Correlates With Clinical and Serological Features in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2016;68(4):440-5.
361. Ortiz-Fernández L, García-Lozano JR, Montes-Cano MA, Conde-Jaldón M, Ortego-Centeno N, García-Hernández FJ, Espinosa G, Graña-Gil G, Sánchez-Bursón J, Blanco R, Barnosi-Marín AC, Solans R, Fanlo P, Rodríguez-Carballeira M, Camps T, Castañeda S, Núñez-Roldán A, Martín J, González-Escribano MF. Variants of the IFI16 gene affecting the levels of expression of mRNA are associated with susceptibility to Behçet disease. *J Rheumatol*. 2015;42(4):695-701.
362. Panchenko MV. Structure, function and regulation of jade family PHD finger 1 (JADE1). *Gene*. 2016;589(1):1-11.
363. Quintela M, Sieglaff DH, Gazze AS, Zhang A, Gonzalez D, Francis L, Webb P, Conlan RS. HBO1 directs histone H4 specific acetylation, potentiating mechano-transduction pathways and membrane elasticity in ovarian cancer cells. *Nanomedicine*. 2019;17:254-65.
364. Muhammad SA, Fatima N, Paracha RZ, Ali A, Chen JY. A systematic simulation-based meta-analytical framework for prediction of physiological biomarkers in alopecia. *J Biol Res (Thessalon)*. 2019;26:2.
365. Corre I, Paris F, Huot J. The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells. *Oncotarget*. 2017;8(33):55684-714.
366. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *Embo j*. 2001;20(11):2768-78.
367. Lamalice L, Houle F, Jourdan G, Huot J. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene*. 2004;23(2):434-45.
368. Rousseau S, Houle F, Kotanides H, Witte L, Waltenberger J, Landry J, Huot J. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2

- (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 2000;275(14):10661-72.
369. Trempolec N, Dave-Coll N, Nebreda AR. SnapShot: p38 MAPK substrates. *Cell.* 2013;152(4):924-.e1.
370. Trempolec N, Dave-Coll N, Nebreda AR. SnapShot: p38 MAPK signaling. *Cell.* 2013;152(3):656-.e1.
371. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1754(1-2):253-62.
372. Ahn HJ, Lee DS. Helicobacter pylori in gastric carcinogenesis. *World J Gastrointest Oncol.* 2015;7(12):455-65.
373. Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;18 Suppl 2:1-5.
374. Gout S, Tremblay PL, Huot J. Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25(4):335-44.
375. Tremblay PL, Auger FA, Huot J. Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases. *Oncogene.* 2006;25(50):6563-73.
376. Zhang Z, Jiang D, Wang C, Garzotto M, Kopp R, Wilmot B, Thuillier P, Dang A, Palma A, Farris PE, Shannon J. Polymorphisms in oxidative stress pathway genes and prostate cancer risk. *Cancer Causes Control.* 2019;30(12):1365-75.
377. Costantino F, Talpin A, Said-Nahal R, Leboime A, Zinovieva E, Zelenika D, Gut I, Charon C, Izac B, Weissman M, Chiochia G, Reveille J, Breban M, Garchon HJ. A family-based genome-wide association study reveals an association of spondyloarthritis with MAPK14. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(1):310-4.
378. Wu W, You K, Zhong J, Ruan Z, Wang B. Identification of potential core genes in Kawasaki disease using bioinformatics analysis. *J Int Med Res.* 2019;47(9):4051-8.
379. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffe A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *Journal of Cell Biology.* 1992;119(3):629-41.
380. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature.* 1995;376(6543):768-71.
381. Huh C-G, Factor VM, Sánchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(13):4477-82.
382. Okunishi K, Dohi M, Nakagome K, Tanaka R, Mizuno S, Matsumoto K, Miyazaki J-i, Nakamura T, Yamamoto K. A Novel Role of Hepatocyte Growth Factor as an Immune Regulator through Suppressing Dendritic Cell Function. *The Journal of Immunology.* 2005;175(7):4745-53.
383. Benkhoucha M, Santiago-Raber M-L, Schneiter G, Chofflon M, Funakoshi H, Nakamura T, Lalive PH. Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010;107(14):6424-9.

384. Boccaccio C, Andò M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C, Comoglio PM. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature*. 1998;391(6664):285-8.
385. Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011;3(1 Suppl):S7-s19.
386. Recondo G, Che J, Jänne PA, Awad MM. Targeting MET Dysregulation in Cancer. *Cancer Discov*. 2020;10(7):922-34.
387. Di Renzo MF, Olivero M, Ferro S, Prat M, Bongarzone I, Pilotti S, Belfiore A, Costantino A, Vigneri R, Pierotti MA, et al. Overexpression of the c-MET/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. *Oncogene*. 1992;7(12):2549-53.
388. Takeuchi H, Bilchik A, Saha S, Turner R, Wiese D, Tanaka M, Kuo C, Wang HJ, Hoon DS. c-MET expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases. *Clin Cancer Res*. 2003;9(4):1480-8.
389. Koch JP, Aebbersold DM, Zimmer Y, Medová M. MET targeting: time for a rematch. *Oncogene*. 2020;39(14):2845-62.
390. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(12):915-25.
391. El Bouchtaoui M, Do Cruzeiro M, Leboeuf C, Loisel-Ferreira I, Fedronie C, Ferreira C, Ait El Far R, Zioli M, Espié M, Falgarone G, Cassinat B, Kiladjian JJ, Feugeas JP, Janin A, Bousquet G. A Constitutional Activating MET Mutation Makes the Genetic Link between Malignancies and Chronic Inflammatory Diseases. *Clin Cancer Res*. 2019;25(14):4504-15.
392. Gallay L, Mouchiroud G, Chazaud B. Interferon-signature in idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol*. 2019;31(6):634-42.
393. Uruha A, Nishikawa A, Tsuburaya RS, Hamanaka K, Kuwana M, Watanabe Y, Suzuki S, Suzuki N, Nishino I. Sarcoplasmic MxA expression: A valuable marker of dermatomyositis. *Neurology*. 2017;88(5):493-500.
394. McAdara Berkowitz JK, Catz SD, Johnson JL, Ruedi JM, Thon V, Babior BM. JFC1, a novel tandem C2 domain-containing protein associated with the leukocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 2001;276(22):18855-62.
395. Fukuda M, Mikoshiba K. Synaptotagmin-like protein 1-3: a novel family of C-terminal-type tandem C2 proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(5):1226-33.
396. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):107-17.
397. Neumüller O, Hoffmeister M, Babica J, Prella C, Gegenbauer K, Smolenski AP. Synaptotagmin-like protein 1 interacts with the GTPase-activating protein Rap1GAP2 and regulates dense granule secretion in platelets. *Blood*. 2009;114(7):1396-404.
398. Brzezinska AA, Johnson JL, Munafo DB, Crozat K, Beutler B, Kiosses WB, Ellis BA, Catz SD. The Rab27a effectors JFC1/Slp1 and Munc13-4 regulate exocytosis of neutrophil granules. *Traffic*. 2008;9(12):2151-64.
399. Ramadass M, Johnson JL, Marki A, Zhang J, Wolf D, Kiosses WB, Pestonjamas K, Ley K, Catz SD. The trafficking protein JFC1 regulates Rac1-GTP localization at the uropod controlling neutrophil chemotaxis and in vivo migration. *J Leukoc Biol*. 2019;105(6):1209-24.
400. Johnson JL, Pacquelet S, Lane WS, Eam B, Catz SD. Akt regulates the subcellular localization of the Rab27a-binding protein JFC1 by phosphorylation. *Traffic*. 2005;6(8):667-81.

401. Matzaraki V, Kumar V, Wijmenga C, Zhernakova A. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biol.* 2017;18(1):76.
402. O'Hanlon TP, Carrick DM, Arnett FC, Reveille JD, Carrington M, Gao X, Oddis CV, Morel PA, Malley JD, Malley K, Dreyfuss J, Shamim EA, Rider LG, Chanock SJ, Foster CB, Bunch T, Plotz PH, Love LA, Miller FW. Immunogenetic risk and protective factors for the idiopathic inflammatory myopathies: distinct HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 and -DQA1 allelic profiles and motifs define clinicopathologic groups in caucasians. *Medicine (Baltimore).* 2005;84(6):338-49.
403. O'Hanlon TP, Rider LG, Mamyrova G, Targoff IN, Arnett FC, Reveille JD, Carrington M, Gao X, Oddis CV, Morel PA, Malley JD, Malley K, Shamim EA, Chanock SJ, Foster CB, Bunch T, Reed AM, Love LA, Miller FW. HLA polymorphisms in African Americans with idiopathic inflammatory myopathy: allelic profiles distinguish patients with different clinical phenotypes and myositis autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 2006;54(11):3670-81.
404. Mierau R, Dick T, Bartz-Bazzanella P, Keller E, Albert ED, Genth E. Strong association of dermatomyositis-specific Mi-2 autoantibodies with a tryptophan at position 9 of the HLA-DR beta chain. *Arthritis Rheum.* 1996;39(5):868-76.
405. Shamim EA, Rider LG, Pandey JP, O'Hanlon TP, Jara LJ, Samayoa EA, Burgos-Vargas R, Vazquez-Mellado J, Alcocer-Varela J, Salazar-Paramo M, Kutzbach AG, Malley JD, Targoff IN, Garcia-De la Torre I, Miller FW. Differences in idiopathic inflammatory myopathy phenotypes and genotypes between Mesoamerican Mestizos and North American Caucasians: ethnogeographic influences in the genetics and clinical expression of myositis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(7):1885-93.
406. Chen Z, Wang Y, Kuwana M, Xu X, Hu W, Feng X, Wang H, Kimura A, Sun L. HLA-DRB1 Alleles as Genetic Risk Factors for the Development of Anti-MDA5 Antibodies in Patients with Dermatomyositis. *J Rheumatol.* 2017;44(9):1389-93.
407. Lin JM, Zhang YB, Peng QL, Yang HB, Shi JL, Gu ML, Zhao WM, Wang GC. Genetic association of HLA-DRB1 multiple polymorphisms with dermatomyositis in Chinese population. *Hla.* 2017;90(6):354-9.
408. O'Hanlon TP, Carrick DM, Targoff IN, Arnett FC, Reveille JD, Carrington M, Gao X, Oddis CV, Morel PA, Malley JD, Malley K, Shamim EA, Rider LG, Chanock SJ, Foster CB, Bunch T, Blackshear PJ, Plotz PH, Love LA, Miller FW. Immunogenetic risk and protective factors for the idiopathic inflammatory myopathies: distinct HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, and -DQA1 allelic profiles distinguish European American patients with different myositis autoantibodies. *Medicine (Baltimore).* 2006;85(2):111-27.
409. Rothwell S, Cooper RG, Lundberg IE, Miller FW, Gregersen PK, Bowes J, Vencovsky J, Danko K, Limaye V, Selva-O'Callaghan A, Hanna MG, Machado PM, Pachman LM, Reed AM, Rider LG, Cobb J, Platt H, Molberg Ø, Benveniste O, Mathiesen P, Radstake T, Doria A, De Bleecker J, De Paepe B, Maurer B, Ollier WE, Padyukov L, O'Hanlon TP, Lee A, Amos CI, Gieger C, Meitinger T, Winkelmann J, Wedderburn LR, Chinoy H, Lamb JA. Dense genotyping of immune-related loci in idiopathic inflammatory myopathies confirms HLA alleles as the strongest genetic risk factor and suggests different genetic background for major clinical subgroups. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(8):1558-66.
410. Gao X, Han L, Yuan L, Yang Y, Gou G, Sun H, Lu L, Bao L. HLA class II alleles may influence susceptibility to adult dermatomyositis and polymyositis in a Han Chinese population. *BMC Dermatol.* 2014;14:9.

411. Chinoy H, Salway F, Fertig N, Shephard N, Tait BD, Thomson W, Isenberg DA, Oddis CV, Silman AJ, Ollier WE, Cooper RG. In adult onset myositis, the presence of interstitial lung disease and myositis specific/associated antibodies are governed by HLA class II haplotype, rather than by myositis subtype. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(1):R13.
412. Chen Z, Cao M, Plana MN, Liang J, Cai H, Kuwana M, Sun L. Utility of anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody measurement in identifying patients with dermatomyositis and a high risk for developing rapidly progressive interstitial lung disease: a review of the literature and a meta-analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2013;65(8):1316-24.
413. Ioannidis I, McNally B, Willette M, Peeples ME, Chaussabel D, Durbin JE, Ramilo O, Mejias A, Flaño E. Plasticity and virus specificity of the airway epithelial cell immune response during respiratory virus infection. *J Virol.* 2012;86(10):5422-36.
414. Zhai Y, Franco LM, Atmar RL, Quarles JM, Arden N, Bucasas KL, Wells JM, Niño D, Wang X, Zapata GE, Shaw CA, Belmont JW, Couch RB. Host Transcriptional Response to Influenza and Other Acute Respiratory Viral Infections--A Prospective Cohort Study. *PLoS Pathog.* 2015;11(6):e1004869.
415. DeDiego ML, Martinez-Sobrido L, Topham DJ. Novel Functions of IFI44L as a Feedback Regulator of Host Antiviral Responses. *J Virol.* 2019;93(21).
416. DeDiego ML, Nogales A, Martinez-Sobrido L, Topham DJ. Interferon-Induced Protein 44 Interacts with Cellular FK506-Binding Protein 5, Negatively Regulates Host Antiviral Responses, and Supports Virus Replication. *mBio.* 2019;10(4).
417. Karimifar M, Pakzad B, Karimzadeh H, Mousavi M, Kazemi M, Salehi A, Vatandoust N, Amini G, Akbari M, Salehi R. Interferon-induced protein 44-like gene promoter is differentially methylated in peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus patients. *J Res Med Sci.* 2019;24:99.
418. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature.* 2011;472(7344):481-5.
419. Coit P, Jeffries M, Altorok N, Dozmorov MG, Koelsch KA, Wren JD, Merrill JT, McCune WJ, Sawalha AH. Genome-wide DNA methylation study suggests epigenetic accessibility and transcriptional poising of interferon-regulated genes in naïve CD4+ T cells from lupus patients. *J Autoimmun.* 2013;43:78-84.
420. Absher DM, Li X, Waite LL, Gibson A, Roberts K, Edberg J, Chatham WW, Kimberly RP. Genome-wide DNA methylation analysis of systemic lupus erythematosus reveals persistent hypomethylation of interferon genes and compositional changes to CD4+ T-cell populations. *PLoS Genet.* 2013;9(8):e1003678.
421. Coit P, Yalavarthi S, Ognenovski M, Zhao W, Hasni S, Wren JD, Kaplan MJ, Sawalha AH. Epigenome profiling reveals significant DNA demethylation of interferon signature genes in lupus neutrophils. *J Autoimmun.* 2015;58:59-66.
422. Zhao M, Zhou Y, Zhu B, Wan M, Jiang T, Tan Q, Liu Y, Jiang J, Luo S, Tan Y, Wu H, Renauer P, Del Mar Ayala Gutiérrez M, Castillo Palma MJ, Ortega Castro R, Fernández-Roldán C, Raya E, Faria R, Carvalho C, Alarcón-Riquelme ME, Xiang Z, Chen J, Li F, Ling G, Zhao H, Liao X, Lin Y, Sawalha AH, Lu Q. IFI44L promoter methylation as a blood biomarker for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(11):1998-2006.
423. Hornung T, Janzen V, Heidgen FJ, Wolf D, Bieber T, Wenzel J. Remission of recalcitrant dermatomyositis treated with ruxolitinib. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2537-8.

424. Kurasawa K, Arai S, Namiki Y, Tanaka A, Takamura Y, Owada T, Arima M, Maezawa R. Tofacitinib for refractory interstitial lung diseases in anti-melanoma differentiation-associated 5 gene antibody-positive dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(12):2114-9.
425. Kurtzman DJ, Wright NA, Lin J, Femia AN, Merola JF, Patel M, Vleugels RA. Tofacitinib Citrate for Refractory Cutaneous Dermatomyositis: An Alternative Treatment. *JAMA Dermatol*. 2016;152(8):944-5.
426. Ladislau L, Suárez-Calvet X, Toquet S, Landon-Cardinal O, Amelin D, Depp M, Rodero MP, Hathazi D, Duffy D, Bondet V, Preusse C, Bienvenu B, Rozenberg F, Roos A, Benjamim CF, Gallardo E, Illa I, Mouly V, Stenzel W, Butler-Browne G, Benveniste O, Allenbach Y. JAK inhibitor improves type I interferon induced damage: proof of concept in dermatomyositis. *Brain*. 2018;141(6):1609-21.
427. Paik JJ, Christopher-Stine L. A case of refractory dermatomyositis responsive to tofacitinib. *Semin Arthritis Rheum*. 2017;46(4):e19.
428. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 2009;228(1):273-87.
429. Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR, Reddy EP. Jak/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: approaches for targeted therapies. *Genes Cancer*. 2010;1(10):979-93.
430. Oestreich KJ, Weinmann AS. Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(2):191-5.
431. Illa I, Gallardo E, Gimeno R, Serrano C, Ferrer I, Juárez C. Signal transducer and activator of transcription 1 in human muscle: implications in inflammatory myopathies. *Am J Pathol*. 1997;151(1):81-8.
432. Xu Q, Jin X, Jiang Y, Dang X, Han Y. The relationship between JAK2(V617F) mutation and dermatomyositis-a case report and literature review. *Clin Rheumatol*. 2020.
433. Schieber M, Crispino JD, Stein B. Myelofibrosis in 2019: moving beyond JAK2 inhibition. *Blood Cancer Journal*. 2019;9(9):74.
434. Prestipino A, Emhardt AJ, Aumann K, O'Sullivan D, Gorantla SP, Duquesne S, Melchinger W, Braun L, Vuckovic S, Boerries M, Busch H, Halbach S, Pennisi S, Poggio T, Apostolova P, Veratti P, Hettich M, Niedermann G, Bartholomä M, Shoumariyeh K, Jutzi JS, Wehrle J, Dierks C, Becker H, Schmitt-Graeff A, Follo M, Pfeifer D, Rohr J, Fuchs S, Ehl S, Hartl FA, Minguet S, Miething C, Heidel FH, Kröger N, Triviai I, Brummer T, Finke J, Illert AL, Ruggiero E, Bonini C, Duyster J, Pahl HL, Lane SW, Hill GR, Blazar BR, von Bubnoff N, Pearce EL, Zeiser R. Oncogenic JAK2(V617F) causes PD-L1 expression, mediating immune escape in myeloproliferative neoplasms. *Sci Transl Med*. 2018;10(429).
435. Gorlova OY, Li Y, Gorlov I, Ying J, Chen WV, Assassi S, Reveille JD, Arnett FC, Zhou X, Bossini-Castillo L, Lopez-Isaac E, Acosta-Herrera M, Gregersen PK, Lee AT, Steen VD, Fessler BJ, Khanna D, Schiopu E, Silver RM, Molitor JA, Furst DE, Kafaja S, Simms RW, Lafyatis RA, Carreira P, Simeon CP, Castellvi I, Beltran E, Ortego N, Amos CI, Martin J, Mayes MD. Gene-level association analysis of systemic sclerosis: A comparison of African-Americans and White populations. *PLoS One*. 2018;13(1):e0189498.
436. Chen Z, Guo Z, Ma J, Liu F, Gao C, Liu S, Wang A, Wu R. STAT1 single nucleotide polymorphisms and susceptibility to immune thrombocytopenia. *Autoimmunity*. 2015;48(5):305-12.

437. Hu K, Hou S, Jiang Z, Kijlstra A, Yang P. JAK2 and STAT3 polymorphisms in a Han Chinese population with Behçet's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(1):538-41.
438. Adams S. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy.* 2009;1(6):949-64.
439. Drexler SK, Foxwell BM. The role of toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(4):506-18.
440. Yu L, Wang L, Chen S. Dual character of Toll-like receptor signaling: pro-tumorigenic effects and anti-tumor functions. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1835(2):144-54.
441. Bourquin C, Hotz C, Noerenberg D, Voelkl A, Heidegger S, Roetzer LC, Storch B, Sandholzer N, Wurzenberger C, Anz D, Endres S. Systemic cancer therapy with a small molecule agonist of toll-like receptor 7 can be improved by circumventing TLR tolerance. *Cancer Res.* 2011;71(15):5123-33.
442. Shetab Boushehri MA, Lamprecht A. TLR4-Based Immunotherapeutics in Cancer: A Review of the Achievements and Shortcomings. *Mol Pharm.* 2018;15(11):4777-800.
443. Galluzzi L, Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Sautès-Fridman C, Tartour E, Zitvogel L, Kroemer G. Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2012;1(5):699-716.
444. Peri F, Piazza M. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists. *Biotechnol Adv.* 2012;30(1):251-60.
445. Dunne A, Marshall NA, Mills KH. TLR based therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(4):404-11.
446. Kim GT, Cho ML, Park YE, Yoo WH, Kim JH, Oh HJ, Kim DS, Baek SH, Lee SH, Lee JH, Kim HY, Kim SI. Expression of TLR2, TLR4, and TLR9 in dermatomyositis and polymyositis. *Clin Rheumatol.* 2010;29(3):273-9.
447. Zong M, Bruton JD, Grundtman C, Yang H, Li JH, Alexanderson H, Palmblad K, Andersson U, Harris HE, Lundberg IE, Westerblad H. TLR4 as receptor for HMGB1 induced muscle dysfunction in myositis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(8):1390-9.
448. Li L, Dai T, Lv J, Ji K, Liu J, Zhang B, Yan C. Role of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene I in endogenous production of type I interferon in dermatomyositis. *J Neuroimmunol.* 2015;285:161-8.
449. Brunn A, Zornbach K, Hans VH, Haupt WF, Deckert M. Toll-like receptors promote inflammation in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012;71(10):855-67.
450. Dhaouadi T, Sfar I, Haouami Y, Abdelmoula L, Turki S, Hassine LB, Zouari R, Khedher A, Khalfallah N, Abdallah TB, Gorgi Y. Polymorphisms of Toll-like receptor-4 and CD14 in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Biomark Res.* 2013;1(1):20.
451. Smith RL, Hébert HL, Massey J, Bowes J, Marzo-Ortega H, Ho P, McHugh NJ, Worthington J, Barton A, Griffiths CE, Warren RB. Association of Toll-like receptor 4 (TLR4) with chronic plaque type psoriasis and psoriatic arthritis. *Arch Dermatol Res.* 2016;308(3):201-5.
452. Shi G, Wang T, Li S, Cheng Y, Sheng P, Fan Y, Zhu K. TLR2 and TLR4 polymorphisms in Southern Chinese Psoriasis Vulgaris patients. *J Dermatol Sci.* 2016;83(2):145-7.
453. Yang H, Wei C, Li Q, Shou T, Yang Y, Xiao C, Yu M, Li M, Yang Z, Zhang J, Zheng B. Association of TLR4 gene non-missense single nucleotide polymorphisms with

- rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *Rheumatol Int.* 2013;33(5):1283-8.
454. Chen SY, Chen CH, Huang YC, Chan CJ, Chen DC, Tsai FJ. Genetic susceptibility to idiopathic membranous nephropathy in high-prevalence Area, Taiwan. *Biomedicine (Taipei)*. 2014;4(2):9.
455. Traks T, Keermann M, Karelson M, Rätsep R, Reimann E, Silm H, Vasar E, Köks S, Kingo K. Polymorphisms in Toll-like receptor genes are associated with vitiligo. *Front Genet.* 2015;6:278.
456. Umemura T, Katsuyama Y, Hamano H, Kitahara K, Takayama M, Arakura N, Kawa S, Tanaka E, Ota M. Association analysis of Toll-like receptor 4 polymorphisms with autoimmune pancreatitis. *Hum Immunol.* 2009;70(9):742-6.
457. Santin I, Castellanos-Rubio A, Hualde I, Castaño L, Vitoria JC, Bilbao JR. Toll-like receptor 4 (TLR4) gene polymorphisms in celiac disease. *Tissue Antigens.* 2007;70(6):495-8.
458. Nyati KK, Prasad KN, Verma A, Singh AK, Rizwan A, Sinha S, Paliwal VK, Pradhan S. Association of TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with Guillain-Barré syndrome in Northern Indian population. *J Neuroimmunol.* 2010;218(1-2):116-9.
459. Garcia-Pavia P, Cobo-Marcos M, Guzzo-Merello G, Gomez-Bueno M, Bornstein B, Lara-Pezzi E, Segovia J, Alonso-Pulpon L. Genetics in dilated cardiomyopathy. *Biomark Med.* 2013;7(4):517-33.
460. Fatkin D, Huttner IG. Titin-truncating mutations in dilated cardiomyopathy: the long and short of it. *Curr Opin Cardiol.* 2017.
461. Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, Witt CC, Labeit D, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res.* 2001;89(11):1065-72.
462. Fürst DO, Osborn M, Nave R, Weber K. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol.* 1988;106(5):1563-72.
463. Granzier HL, Labeit S. Titin and its associated proteins: the third myofilament system of the sarcomere. *Adv Protein Chem.* 2005;71:89-119.
464. Granzier HL, Labeit S. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res.* 2004;94(3):284-95.
465. Labeit S, Kolmerer B. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science.* 1995;270(5234):293-6.
466. Begay RL, Graw S, Sinagra G, Merlo M, Slavov D, Gowan K, Jones KL, Barbati G, Spezzacatene A, Brun F, Di Lenarda A, Smith JE, Granzier HL, Mestroni L, Taylor M. Role of Titin Missense Variants in Dilated Cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(11).
467. Ceyhan-Birsoy O, Agrawal PB, Hidalgo C, Schmitz-Abe K, DeChene ET, Swanson LC, Soemedi R, Vasli N, Iannaccone ST, Shieh PB, Shur N, Dennison JM, Lawlor MW, Laporte J, Markianos K, Fairbrother WG, Granzier H, Beggs AH. Recessive truncating titin gene, TTN, mutations presenting as centronuclear myopathy. *Neurology.* 2013;81(14):1205-14.
468. Evilä A, Palmio J, Vihola A, Savarese M, Tasca G, Penttilä S, Lehtinen S, Jonson PH, De Bleecker J, Rainer P, Auer-Grumbach M, Pouget J, Salort-Campana E, Vilchez JJ, Muelas N, Olive M, Hackman P, Udd B. Targeted Next-Generation

- Sequencing Reveals Novel TTN Mutations Causing Recessive Distal Titinopathy. *Mol Neurobiol.* 2017;54(9):7212-23.
469. Herman DS, Lam L, Taylor MR, Wang L, Teekakirikul P, Christodoulou D, Conner L, DePalma SR, McDonough B, Sparks E, Teodorescu DL, Cirino AL, Banner NR, Pennell DJ, Graw S, Merlo M, Di Lenarda A, Sinagra G, Bos JM, Ackerman MJ, Mitchell RN, Murry CE, Lakdawala NK, Ho CY, Barton PJ, Cook SA, Mestroni L, Seidman JG, Seidman CE. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2012;366(7):619-28.
470. LeWinter MM, Granzier HL. Titin is a major human disease gene. *Circulation.* 2013;127(8):938-44.
471. LeWinter MM, Granzier HL. Cardiac titin and heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014;63(3):207-12.
472. Ottenheijm CA, Granzier H. Lifting the nebula: novel insights into skeletal muscle contractility. *Physiology (Bethesda).* 2010;25(5):304-10.
473. Roberts AM, Ware JS, Herman DS, Schafer S, Baksi J, Bick AG, Buchan RJ, Walsh R, John S, Wilkinson S, Mazzarotto F, Felkin LE, Gong S, MacArthur JA, Cunningham F, Flannick J, Gabriel SB, Altshuler DM, Macdonald PS, Heinig M, Keogh AM, Hayward CS, Banner NR, Pennell DJ, O'Regan DP, San TR, de Marvao A, Dawes TJ, Gulati A, Birks EJ, Yacoub MH, Radke M, Gotthardt M, Wilson JG, O'Donnell CJ, Prasad SK, Barton PJ, Fatkin D, Hubner N, Seidman JG, Seidman CE, Cook SA. Integrated allelic, transcriptional, and phenomic dissection of the cardiac effects of titin truncations in health and disease. *Sci Transl Med.* 2015;7(270):270ra6.
474. Savarese M, Sarparanta J, Vihola A, Udd B, Hackman P. Increasing Role of Titin Mutations in Neuromuscular Disorders. *J Neuromuscul Dis.* 2016;3(3):293-308.
475. Schafer S, de Marvao A, Adami E, Fiedler LR, Ng B, Khin E, Rackham OJ, van Heesch S, Pua CJ, Kui M, Walsh R, Tayal U, Prasad SK, Dawes TJ, Ko NS, Sim D, Chan LL, Chin CW, Mazzarotto F, Barton PJ, Kreuchwig F, de Kleijn DP, Totman T, Biffi C, Tee N, Rueckert D, Schneider V, Faber A, Regitz-Zagrosek V, Seidman JG, Seidman CE, Linke WA, Kovalik JP, O'Regan D, Ware JS, Hubner N, Cook SA. Titin-truncating variants affect heart function in disease cohorts and the general population. *Nat Genet.* 2017;49(1):46-53.
476. Akinrinade O, Koskenvuo JW, Alastalo TP. Prevalence of Titin Truncating Variants in General Population. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145284.
477. Hershberger RE, Siegfried JD. Update 2011: clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(16):1641-9.
478. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kühl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J.* 2008;29(2):270-6.
479. Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. *Lancet.* 2010;375(9716):752-62.
480. Fang HJ, Liu BP. Prevalence of TTN mutations in patients with dilated cardiomyopathy : A meta-analysis. *Herz.* 2019.
481. Chauveau C, Bonnemann CG, Julien C, Kho AL, Marks H, Talim B, Maury P, Arne-Bes MC, Uro-Coste E, Alexandrovich A, Vihola A, Schafer S, Kaufmann B, Medne L, Hübner N, Foley AR, Santi M, Udd B, Topaloglu H, Moore SA, Gotthardt M, Samuels ME, Gautel M, Ferreira A. Recessive TTN truncating mutations define novel forms of core myopathy with heart disease. *Hum Mol Genet.* 2014;23(4):980-91.

482. Ávila-Polo R, Malfatti E, Lornage X, Cheraud C, Nelson I, Nectoux J, Böhm J, Schneider R, Hedberg-Oldfors C, Eymard B, Monges S, Lubieniecki F, Brochier G, Thao Bui M, Madelaine A, Labasse C, Beuvin M, Lacène E, Boland A, Deleuze JF, Thompson J, Richard I, Taratuto AL, Udd B, Leturcq F, Bonne G, Oldfors A, Laporte J, Romero NB. Loss of Sarcomeric Scaffolding as a Common Baseline Histopathologic Lesion in Titin-Related Myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2018;77(12):1101-14.
483. Perrin A, Metay C, Villanova M, Carlier RY, Pegoraro E, Juntas Morales R, Stojkovic T, Richard I, Richard P, Romero NB, Granzier H, Koenig M, Malfatti E, Cossée M. A new congenital multicore titinopathy associated with fast myosin heavy chain deficiency. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020;7(5):846-54.
484. De Cid R, Ben Yaou R, Roudaut C, Charton K, Baulande S, Leturcq F, Romero NB, Malfatti E, Beuvin M, Vihola A, Criqui A, Nelson I, Nectoux J, Ben Aim L, Caloustian C, Olaso R, Udd B, Bonne G, Eymard B, Richard I. A new titinopathy: Childhood-juvenile onset Emery-Dreifuss-like phenotype without cardiomyopathy. *Neurology.* 2015;85(24):2126-35.
485. Jia Q, Wang J, He N, He J, Zhu B. Titin mutation associated with responsiveness to checkpoint blockades in solid tumors. *JCI Insight.* 2019;4(10).
486. Benjannet S, Hamelin J, Chrétien M, Seidah NG. Loss- and gain-of-function PCSK9 variants: cleavage specificity, dominant negative effects, and low density lipoprotein receptor (LDLR) degradation. *J Biol Chem.* 2012;287(40):33745-55.
487. Lee W, Zhang Y, Mukhyala K, Lazarus RA, Zhang Z. Bi-directional SIFT predicts a subset of activating mutations. *PLoS One.* 2009;4(12):e8311.
488. MacArthur DG, Balasubramanian S, Frankish A, Huang N, Morris J, Walter K, Jostins L, Habegger L, Pickrell JK, Montgomery SB, Albers CA, Zhang ZD, Conrad DF, Lunter G, Zheng H, Ayub Q, DePristo MA, Banks E, Hu M, Handsaker RE, Rosenfeld JA, Fromer M, Jin M, Mu XJ, Khurana E, Ye K, Kay M, Saunders GI, Suner MM, Hunt T, Barnes IH, Amid C, Carvalho-Silva DR, Bignell AH, Snow C, Yngvadottir B, Bumpstead S, Cooper DN, Xue Y, Romero IG, Wang J, Li Y, Gibbs RA, McCarroll SA, Dermitzakis ET, Pritchard JK, Barrett JC, Harrow J, Hurles ME, Gerstein MB, Tyler-Smith C. A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. *Science.* 2012;335(6070):823-8.
489. Strano S, Dell'Orso S, Mongiovi AM, Monti O, Lapi E, Di Agostino S, Fontemaggi G, Blandino G. Mutant p53 proteins: between loss and gain of function. *Head Neck.* 2007;29(5):488-96.
490. Bogdanov I, Kazandjieva J, Darlenski R, Tsankov N. Dermatomyositis: Current concepts. *Clin Dermatol.* 2018;36(4):450-8.
491. Wu H, Chen Y, Zhu H, Zhao M, Lu Q. The Pathogenic Role of Dysregulated Epigenetic Modifications in Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:2305.
492. Ballestar E. Epigenetics lessons from twins: prospects for autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010;39(1):30-41.
493. Jeffries MA, Sawalha AH. Epigenetics in systemic lupus erythematosus: leading the way for specific therapeutic agents. *Int J Clin Rheumatol.* 2011;6(4):423-39.
494. Brown CC, Wedderburn LR. Genetics: Mapping autoimmune disease epigenetics: what's on the horizon? *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(3):131-2.
495. Jeffries MA, Sawalha AH. Autoimmune disease in the epigenetic era: how has epigenetics changed our understanding of disease and how can we expect the field to evolve? *Expert Rev Clin Immunol.* 2015;11(1):45-58.
496. Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubreva J, Berdasco M, Fraga MF, O'Hanlon TP, Rider LG, Jacinto FV, Lopez-

- Longo FJ, Dopazo J, Forn M, Peinado MA, Carreño L, Sawalha AH, Harley JB, Siebert R, Esteller M, Miller FW, Ballestar E. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res.* 2010;20(2):170-9.
497. Zhao M, Liu S, Luo S, Wu H, Tang M, Cheng W, Zhang Q, Zhang P, Yu X, Xia Y, Yi N, Gao F, Wang L, Yung S, Chan TM, Sawalha AH, Richardson B, Gershwin ME, Li N, Lu Q. DNA methylation and mRNA and microRNA expression of SLE CD4+ T cells correlate with disease phenotype. *J Autoimmun.* 2014;54:127-36.
498. Garaud S, Le Dantec C, Jousse-Joulin S, Hanrotel-Saliou C, Saraux A, Mageed RA, Youinou P, Renaudineau Y. IL-6 modulates CD5 expression in B cells from patients with lupus by regulating DNA methylation. *J Immunol.* 2009;182(9):5623-32.
499. Zhang P, Zhao M, Liang G, Yin G, Huang D, Su F, Zhai H, Wang L, Su Y, Lu Q. Whole-genome DNA methylation in skin lesions from patients with psoriasis vulgaris. *J Autoimmun.* 2013;41:17-24.
500. Nakano K, Whitaker JW, Boyle DL, Wang W, Firestein GS. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(1):110-7.
501. Neidhart M, Rethage J, Kuchen S, Künzler P, Crowl RM, Billingham ME, Gay RE, Gay S. Retrotransposable L1 elements expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue: association with genomic DNA hypomethylation and influence on gene expression. *Arthritis Rheum.* 2000;43(12):2634-47.
502. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, Ripke S, Lee JC, Jostins L, Shah T, Abedian S, Cheon JH, Cho J, Daryani NE, Franke L, Fuyuno Y, Hart A, Juyal RC, Juyal G, Kim WH, Morris AP, Poustchi H, Newman WG, Midha V, Orchard TR, Vahedi H, Sood A, Sung JJY, Malekzadeh R, Westra H-J, Yamazaki K, Yang S-K, Barrett JC, Franke A, Alizadeh BZ, Parkes M, B K T, Daly MJ, Kubo M, Anderson CA, Weersma RK, International Multiple Sclerosis Genetics C, International IBDGC. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nature Genetics.* 2015;47(9):979-86.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Alina Scholz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Identifikation pathogenetischer Signaturen für die Dermatomyositis – mit Fokus auf PD1 und Typ I Interferon Signalwegen; Identification of pathogenic signatures of Dermatomyositis – with focus on PD1 and type 1 interferone signalling pathways] 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.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bei all jenen Personen bedanken, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben:

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Heppner für die Möglichkeit, meine Dissertation an seinem Institut anzufertigen sowie beim gesamten Team des Instituts der Neuropathologie.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Werner Stenzel der durch seine endlose Geduld, Hilfsbereitschaft und Unterstützung diese Arbeit erst möglich gemacht hat. Zu jedem Zeitpunkt war er für konstruktive Gespräche und Diskussionen erreichbar und schaffte durch seine freundliche Art eine unglaublich angenehme Arbeitsatmosphäre. Es war wirklich ein großes Glück diese Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Stenzel anfertigen zu können.

Mein außerordentlicher Dank gilt Corinna Preuße, ohne deren mühevollen Geduld und ständiges Verständnis in dieser beschwerlichen Zeit ein solcher Arbeitsumfang niemals hätte gelingen können. Die mehrfache Durchsicht dieser Promotion, ihre kritischen Betrachtungen, ihre differenzierten Anmerkungen sowie die mit ihr zweckdienlichen Diskussionen, vor allem aber ihr moralischer Beistand und der menschliche Halt, haben mir Kraft und Mut zur Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation gegeben. Deswegen gebührt ihr hier mein voller und besonders herauszustellender Dank.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinem Freund, Philipp Sikorski, für seine unglaublich hilfreiche Unterstützung und seinem Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Zuletzt möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meiner Mutter und meinen Großeltern bedanken, ohne die weder ein Studium der Medizin noch die Anfertigung dieser Arbeit möglich gewesen wären. Danke für eure immerwährende, bedingungslose Unterstützung und eure Geduld bei all meinen Vorhaben.