

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Humorale Immunreaktivitäten
gegen Muskelzell-Membranproteine
bei entzündlichen Myositiden**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Verena Lehmann
aus
Hohenmölsen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Gerd R. Burmester
 2. Prof. Dr. med. Joachim R. Kalden
 3. Prof. Dr. med. Ulf Müller-Ladner

Datum der Promotion: 19.11.2010

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	6
1.1. Vorausgehende Betrachtungen	6
1.1.1. Klassifikation der Myositiden nach Messner	7
1.1.2. Klassifikation der Myositiden nach Burmester	8
1.2. Ätiologie und Pathogenese der Polymyositis, Dermatomyositis sowie der Einschlusskörperchen-Myositis	9
1.3. Inzidenz und klinische Symptomatik der Polymyositis, Dermatomyositis und der Inclusion Body Myositis	10
1.3.1. Klassifikationskriterien nach Bohan und Peter	10
1.3.2. Inzidenz	13
1.4. Diagnosesicherung	14
1.4.1. Elektromyographie, Muskelbiopsie und Histologie	14
1.4.2. Labordiagnostik	15
1.4.3. Myositis spezifische Autoantikörper	16
1.4.4. Myositis assoziierte Autoantikörper	18
1.4.5. Nachweis von Autoantikörpern mit Hilfe von Mikroarrays bei rheumatoiden Erkrankungen	18
1.5. Therapie und Prognose	20
1.6. Systemischer Lupus erythematodes	23
1.6.1. Definition, Pathologie und Epidemiologie des Lupus erythematodes	23
1.6.2. Klinische Erscheinung des Lupus erythematodes nach den Kriterien der American Rheumatism Association	23
1.7. Rheumatoide Arthritis und reaktive Arthritis	25
1.7.1. Definition und Ätiologie der rheumatoiden-und reaktiven Arthritis	25
1.7.2. Klinik der rheumatoiden Arthritis nach der Klassifikation der American Rheumatism Association	26
1.7.3. Verlauf und Prognose der rheumatoiden Arthritis	27

2.	Zielsetzung	28
3.	Material und Methoden	30
3.1.	Material	30
3.1.1.	Geräte/Hilfsmittel	30
3.1.2.	Biochemische Präparate	30
3.1.3.	Chemikalien	31
3.2.	Methoden	32
3.2.1.	Patienten und Kontrollen	32
3.2.2.	Zellkultur von TE671 Rhabdomyosarkomazellen	33
3.2.3.	Zellmembranpräparation modifiziert nach Gates et al	34
3.2.4.	2D-Elektrophorese	35
3.2.5.	Western-Blot	36
3.2.6.	Biotinylierung von Zellmembranproteinen	37
3.2.7.	Nachweis biotinmarkierter Zellmembranproteine	38
3.2.8.	Proteinfärbung mit Silbernitrat	38
3.2.9.	Aminosäuresequenzierung	39
4.	Ergebnisse	40
4.1.	Überprüfung der Eignung der Membranpräparation durch Biotinylierung	40
4.2.	Darstellung der Gesamtreaktivitäten bei Polymyositis, rheumatoider Arthritis, Lupus erythematodes, juveniler- und reaktiver Arthritis, sowie der gesunden Kontrollgruppe	41
4.3.	Verteilungsmuster der Gesamtreaktivitäten in definierten Bereichen bei Polymyositis, Gesunden, rheumatoider Arthritis, Lupus erythematodes und juveniler- und reaktiver Arthritis	49
4.4.	Grafische Darstellung der prozentualen Häufigkeit der reaktiven Proteine in den einzelnen Teilbereichen bei Polymyositis, rheumatoider Arthritis, Gesunden, Lupus erythematodes, sowie juveniler- und reaktiver Arthritis	53

4.5.	Prozentuale Häufigkeit einzelner spezifischer Oberflächenproteine bei der Polymyositis und der Kontrollgruppe	59
4.5.1.	Charakterisierung der reaktiven Proteinspots durch Aminosäuresequenzierung	64
5.	Diskussion	66
5.1.	Spezifische Oberflächenproteine bei Polymyositis oder rheumatoider Arthritis im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe	66
5.2.	Spezifische Reaktionsmuster bei den untersuchten Autoimmunopathien	73
6.	Zusammenfassung	77
7.	Literaturverzeichnis	80
8.	Tabellen-und Abbildungsverzeichnis	91
9.	Abkürzungsverzeichnis	94
10.	Danksagung	96
11.	Selbständigkeitserklärung	97
12.	Lebenslauf	98
13.	Publikationsliste	100

1. Einleitung

1.1. Vorausgehende Betrachtungen

Die vorliegende Arbeit bezieht sich auf Ergebnisse, bei denen Antikörper gegen Muskeloberflächenproteine bei Myositis nachgewiesen wurden (1). Dabei konnte gezeigt werden, dass insbesondere Seren von Patienten mit Polymyositis (PM) statistisch signifikant mit Muskelzellmembranproteinen in einem speziell entwickelten Zell-ELISA (Cell-Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay) reagierten, der statt definierter Autoantigene intakte Zielzellen als Antigene (humane Rhabdomyosarkomzellen, Zelllinie TE671) verwendete. Durch diese Modifikation gelang es ein System zu etablieren, mit dem man Muskelzell-spezifische Antikörperreaktivitäten gegen die Zellmembran und gegen intrazelluläre Strukturen beurteilen konnte. Dabei wurden zum einen, nicht fixierte lebende Zellen zum Nachweis der Oberflächenantigene und zum anderen, mit Methanol/Eisessig fixierte Zellen, zur Darstellung der intrazellulären Proteinreaktivitäten, benutzt. Beim fixierten-Zell-ELISA, konnten im Vergleich zum nicht fixierten-Zell-ELISA, signifikante verschiedene Serumreaktivitäten gegen äußere und innere Zellstrukturen differenziert werden. Beim fixierten Zell-ELISA wiesen 47% der Polymyositis-Patienten Reaktivitäten auf (1). Dieser Befund korreliert deshalb relativ mit den für die Diagnostik erforderlichen Werten der Jo-1 Autoantikörper Bestimmung. Der nicht fixierte ELISA erbrachte den Beweis, dass es membrangebundene Antigene auf der Muskelzelle geben muss, die möglicherweise in die Antikörperbindung und Auslösung der Autoimmunität verwickelt sind (1). Das Wissen über die auslösenden Faktoren der Erkrankung ist noch sehr unvollständig. Für eine mögliche virale Genese (Coxsackie-, HIV- und Echoviren u.a.), gibt es in neueren Studien Hinweise. Man glaubt heute, dass eine Autoimmunreaktion, bei der es über eine Lymphozytenaktivierung zu Muskelnekrosen kommt, eine entscheidende Rolle spielt. Das auslösende Agens ist dabei noch unbekannt, es wird u.a. aber auch auf der Muskelzelloberfläche vermutet und ist so dem immunologischen System zugänglich. Autoimmunreaktionen können primär oder sekundär sein. Während primäre Reaktionen organspezifisch sind, treten sekundäre Reaktionen im Rahmen von Infektionen oder Malignomen auf und sind systemisch mit ubiquitär vorkommenden Antigenen. Bei der Polymyositis (PM), der Dermatomyositis (DM),

sowie der Einschlusskörperchen-Myositis (Inclusion Body Myositis, IBM), aber auch bei der rheumatoiden Arthritis (RA) und beim systemischen Lupus erythematoses (SLE), wird als pathogenetischer Faktor von einer Erkrankung des Immunsystems, also der eigenen Körperabwehr gegen sich selbst (Autoimmunität), ausgegangen (2). Neben einer chronischen Entzündung im Bereich der Synovia der Gelenke, wie bei der rheumatoiden Arthritis, kann es zu entzündlichen Erkrankungen des Muskels (Myositis) kommen. Die Funktionsstörungen im Bereich der Muskulatur können zentral bedingt sein oder in Höhe der Muskelzelle peripher liegen und endogen oder exogen bedingt sein (3). Eine spezielle Gruppe der Autoimmunopathien stellen die Myositiden dar. Man versteht darunter alle entzündlichen Erkrankungen des Muskels unterschiedlicher Genese.

Je nach Genese, Auftreten im Zusammenhang mit anderen Autoimmunerkrankungen oder Malignomen, sowie entzündlicher Genese durch Viren und Bakterien, werden die Myositiden in folgende Gruppen eingeteilt.

- a) Polymyositis
- b) Dermatomyositis
- c) Einschlusskörperchen-Myositis
- d) Myositiden mit sporadischer Form
- e) Vererbliche (hereditäre) Myositiden
- f) Myositis im Rahmen anderer Systemerkrankungen
- g) Erregerbedingte Myositiden

1.1.1. Klassifikation der Myositiden nach Messner (4)

Es wird in fünf Typklassen unterteilt.

- Typ 1 Erwachsenen Polymyositis
- Typ 2 Dermatomyositis
- Typ 3 Mischformen von Dermato-und Polymyositis bei malignen
 Erkrankungen

- Typ 4 Kindliche Polymyositis, die mit zusätzlichen Vaskulitiden, Fieber und Arthralgien einhergehen kann und auch beim jungen Erwachsenen anzutreffen ist
- Typ 5 Begleitmyositiden, die im Zusammenhang mit anderen Autoimmunerkrankungen, wie RA und SLE mit Muskelbeteiligung auftreten, aber auch bei Kollagenosen mit Muskelbeteiligung (Sklerodermie) oder in Form von sogenannten overlap syndroms

Das gleichzeitige Vorkommen von Eigenschaften von zwei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen wird als overlap syndroms oder als mixed connective tissue disease (MCTD) bezeichnet (Polymyositis und Sklerodermie). Zur diagnostischen Sicherung wurden diagnostische Kriterien aufgestellt, die sowohl die Myositis als auch andere Organbeteiligungen wie Lungenbeteiligung, Raynaud-Phänomen, geschwollene Hände oder Sklerodaktylie berücksichtigen, genauso wie der pathognomonische Antikörpernachweis von ribonukleären Proteinen der Untereinheit U1 (Anti-U1-RNP).

1.1.2. Klassifikation der Myositiden nach Burmester (5)

Eine weitere Klassifizierung der Myositiden stellt die Einteilung nach Burmester dar.

1) Idiopathische Polymyositis

- a) Primäre idiopathische PM
- b) Primäre idiopathische DM
- c) DM oder PM im Kindesalter
- d) DM oder PM in Verbindung mit Malignomen
- e) DM oder PM in Verbindung mit anderen entzündlichen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises
- f) Okuläre Myositis
- g) IBM

2) Interstitielle Myositis

3) Parasitäre, bakterielle oder durch Pilze bedingte Myositiden

4) Myositiden bei generalisierten Virusinfektionen

Unter der idiopathischen Polymyositis versteht man eine Entzündung der Muskulatur, die ohne erkennbare Ursache auftritt.

Die interstitielle Myositis ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Entzündungsherden im Muskelinterstitium und tritt oft begleitend auch bei Erkrankungen des entzündlich-rheumatischen Formenkreises auf.

Erregerbedingte Myositiden umfassen alle Entzündungen der Muskulatur, die durch Erreger verursacht werden. Dazu zählen *Toxoplasma gondii* und *Trichinella spiralis* als Auslöser parasitär bedingter Myositiden.

Clostridium perfringens, Staphylokokken oder Streptokokken sind als Vertreter der bakteriellen Auslöser zu nennen. Bei generalisierten Virusinfektionen, z.B. im Rahmen einer Grippe oder HIV-Infektion, können ebenfalls begleitende Myositiden beobachtet werden.

1.2. Ätiologie und Pathogenese der Polymyositis, Dermatomyositis sowie der Einschlusskörperchen-Myositis

Bei der Polymyositis ergaben immunpathologische Untersuchungen, dass bei zellulären Infiltraten zytotoxische T-Zellen (CD 8+ und von MHC I präsentiert) eine grosse Rolle zu spielen scheinen, während bei der Dermatomyositis vor allem perivaskulär ausgeprägte B-Zell- und CD4+ T-Zellinfiltrate bei nahezu fehlenden Muskelnekrosen vorkommen (6,7,8).

Der wissenschaftliche Nachweis eines oder mehrerer Autoantigene bzw. Autoantikörper ist bis jetzt noch nicht gelungen.

Eine mögliche genetische Disposition könnte eine Rolle für die Ausbildung der Erkrankung spielen. Es ist aufgefallen, dass Patienten mit Polymyositis verstärkt die HLA-DR3 und HLA-B8 Moleküle ausbilden und bei der Dermatomyositis eine Assoziation mit HLA-B14 und HLA-B40 besteht.

Bei der Dermatomyositis sind offenbar die kleinen Gefäße im Muskel das Ziel des Angriffs des Immunsystems. Dadurch kommt es zu Nekrosen und Thrombosen der kleinen Gefäße (Kapillaren). Hieraus resultieren umschriebene Durchblutungsstörungen mit Untergang und Verkleinerung von Muskelfasern (9,10,11,12). Dabei wird der Angriff des Immunsystems nicht nur direkt über die zelluläre Immunreaktion vermittelt, sondern auch über humoral gerichtete

Autoimmunantworten (Immunglobuline) und über Entzündungsproteine des Komplementsystems. Entsprechend finden sich in den perivaskulären Infiltraten (Ansammlung von Entzündungszellen um die Gefäße herum) B-Zell- und T-Helfer-Zellinfiltrate (13,14,15). Dem gegenüber wird bei der Polymyositis und der Einschlusskörperchen-Myositis eine direkte zellvermittelte Immunreaktion gegen Muskelfasern angenommen. Dadurch handelt es sich bei den Infiltraten vorwiegend um CD8+ -Zellen und Makrophagen (16,17,18).

Bei der Einschlusskörperchen-Myositis ähneln die Einschlüsse Bestandteilen von Viren, so dass eine Auslösung der Erkrankung durch Viren diskutiert wird. Bislang fehlen dazu jedoch die endgültigen Beweise. Es wird auch hier von einem möglichen Autoimmunprozess ausgegangen. Eine primär degenerative Ursache (Muskelfasernekrosen anderer Genese) muss ebenso erwogen werden.

1.3. Inzidenz und klinische Symptomatik der Polymyositis, Dermatomyositis und der Inclusion Body Myositis

1.3.1. Klassifikationskriterien nach Bohan und Peter (19)

- a) Kennzeichnend ist die symmetrische, proximale Muskelschwäche, vor allem ist die Muskulatur von Oberschenkeln, Oberarmen, Becken- und Schultergürtel betroffen. Dazu gesellen sich muskelkaterartige Schmerzen sowie Berührungsschmerzen
- b) Die histologisch gesicherten nebeneinander auftretenden Muskelfasernekrosen, Phagozytose und Regeneration mit basophilen, großen vesikulären sarkolemmalen Kernen und prominenten Nukleoli sowie die perifaszikuläre Atrophie
- c) Die Erhöhung der muskeltypischen Enzyme im Serum, insbesondere der Kreatininkinase aber auch der Aldolase, der GOT, GPT und LDH
- d) Ebenso zählt die elektromyographische Trias, bestehend aus kurzen, feinen, polyphasischen Motoreinheiten, Fibrillationen und positiven, scharfen Wellen sowie hochfrequenten wiederholten Entladungen zu den Charakteristika

- e) Eine der charakteristischen Hauterscheinungen der Dermatomyositis, wie die periorbitalen lividen Erytheme oder ein fliederfarbenedes Exanthem (heliotrop), dass vor allem im Gesicht, Dekolleté und Schulterbereich auftritt, ebenso wie Ödeme und eine erythematöse Dermatitis, Plaques (Gottron-Zeichen) und rissige Haut an den Handinnenflächen (Mechanic hands) zählen zu den Einschlusskriterien. Weitere Hauterscheinungen können Teleangiektasien und weiße Gesichtsflecken sein, sowie Exantheme im Bereich der Extremitätenstreckseiten, vor allem am Handrücken und Knöchel, die dann eine tiefrote Färbung zeigen.

Gesichert ist das Vorliegen einer Polymyositis, wenn 4 Kriterien von Bohan und Peter (19) erfüllt sind. Die Dermatomyositis gilt bei Vorhandensein von 3 Kriterien und den Hautveränderungen als gesichert (4,19,20,21).

Zusätzlich ist bei Beteiligung der Ösophagusmuskulatur Dysphagie und Dyspnoe bei Beteiligung der Atemmuskulatur möglich. Hierzu können als unspezifische Entzündungszeichen Fieber, Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit kommen, ebenso wie Konjunktivitis und eventuell auch eine Raynaudsymptomatik (22,23).

Bei der Einschlusskörperchen-Myositis sind die Schwächen oft asymmetrisch angeordnet. Es ergibt sich dabei ein einzigartiges Muster von selektiver Muskelschwäche, die die distalen und proximalen Muskeln (Unterarm- und Oberschenkelmuskulatur stellen typische Manifestationsbereiche dar) umfasst. Bei etwa 60% der Patienten werden Schluckstörungen beobachtet. Des Weiteren kann eine sehr variable Gelenkbeteiligung vorhanden sein, die von flüchtigen Arthralgien bis zu distalen Arthritiden mit Synovitis reichen kann (5,24,25).

Bei einer vizeralen Beteiligung kann die kardiale Muskulatur im Sinne einer interstitiellen Myositis betroffen sein, so dass es zu Reizleitungsstörungen, Blockbildern bis zum möglichen Myokardinfarkt kommen kann.

Nicht vergessen sollte man den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Dermatomyositis und im geringeren Maße bei Polymyositis mit Tumorerkrankungen im Sinne eines paraneoplastischen Syndroms. Die Einschlusskörperchen Myositis ist dahingehend nicht mit dem Auftreten von malignen Erkrankungen assoziiert.

Über den 1. Fall einer Assoziation von Polymyositis und einer malignen Erkrankung berichtete Sterz bereits 1916 (20,26). Im gleichen Jahr wurde

ebenfalls über die Assoziation von Dermatomyositis und Malignität, in dem Fall Brustkrebs, berichtet (20,27).

In einer großangelegten Studie wurden 64 Patienten mit Polymyositis und 28 mit Dermatomyositis über 30 Jahre beobachtet, wobei die Diagnose der Erkrankung nach den Kriterien von Bohan und Peter erfolgte (19,20).

Von dem anfänglichen Kollektiv wurden schließlich 56 Patienten weitergehend untersucht. Dabei hatten 2 Patienten von 37 untersuchten Polymyositis-Erkrankten ein Malignom (entspricht einer Häufigkeit von 3%), sowie 6 von 19 Dermatomyositis-Untersuchten (36%). Dieses Ergebnis reiht sich in die von anderen Autoren berichteten Ergebnisse eines erhöhten Malignitätsrisikos bei Poly- und Dermatomyositis ein. Dies berichteten u.a. Sigurgeirson, Chow oder Zantos (20). Währenddessen konnte bei älteren und kleineren Studien kein signifikant erhöhtes Malignitätsrisiko festgestellt werden (25). Eine signifikante Lokalisation für den Primärtumor konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Währenddessen wurde von Barnes berichtet, dass Brustkrebs die häufigste Neoplasie sei (17,8% von 258 Dermatomyositis-Patienten) (20).

In einer weiteren Studie mit 750 Patienten fand Sigurgeirsson et al. (20,28), dass die häufigsten Lokalisationen für das Auftreten eines Tumors die Lunge und das Kolon seien. Alle Krebserkrankungen wurden innerhalb von 4 Jahren nach Erstdiagnose einer Polymyositis oder Dermatomyositis gestellt. Am häufigsten gelang die Tumordiagnose innerhalb eines Jahres (20).

Ein weiterer Risikofaktor in unseren Breitengraden scheint das männliche Geschlecht zu sein (20). Über ein erhöhtes Lebensalter als Risikofaktor gibt es widersprüchliche Angaben. In der erwähnten Studie erfolgte dahingehend kein Nachweis. Währenddessen berichten Hochberg und Marie, unabhängig voneinander, über ein erhöhtes Mortalitätsrisiko mit zunehmendem Alter bei Männern über 55 Jahren (20).

Die 5-Jahresüberlebensrate bei Polymyositis ohne maligne Erkrankung liegt zwischen 60-80% (20,28,29,30), bei Dermatomyositis 73,6%. Mit begleitender Krebserkrankung war die 4-Jahresüberlebensrate bei Polymyositis 0%. Bei Dermatomyositis lebten nach 5 Jahren noch 10% der Erkrankten (20).

1.3.2. Inzidenz

Die Inzidenz beträgt bei der Polymyositis und der Dermatomyositis zwischen 5 bis 7:1 Mio. Erkrankte jährlich, d.h. von 1 Mio. Einwohner erkranken fünf bis sieben Menschen an Polymyositis oder Dermatomyositis (31). Bei einer 20-jährigen Studie in den USA von 1963-82, ergab sich eine Inzidenz von 5,5 Erkrankten pro 1 Mio. Einwohner (24).

Frauen erkranken dabei im Vergleich zu Männern in einem Verhältnis von 2:1. Es bestehen zwei Erkrankungsgipfel. Einmal bei den kindlichen Formen zwischen dem 5. bis 15. Lebensjahr und zum anderen eine ausgeprägtere Häufung jenseits des 45. Lebensjahres (zwischen dem 45. bis 64. Lebensjahr). Zuverlässige Daten, in bezug auf die Prävalenz der Erkrankung, sind sehr spärlich. Schätzungen aus den USA und Japan gehen von einer Prävalenz bei der Poly- und Dermatomyositis von 0,005 - 0,0063 aus (24).

Der Begriff der Inclusion Body Myositis (IBM) wurde 1971 geprägt. Zunächst als eine Sonderform der Polymyositis, stellt sie heute ein eigenständiges Krankheitsbild dar. Sie tritt meistens jenseits des 50. Lebensjahres auf, mit einer Dominanz des weiblichen Geschlechtes in der Erkrankungswahrscheinlichkeit gegenüber dem männlichen Geschlecht im Verhältnis von 3:1 und einer Inzidenz von 5-9 Erkrankte pro 1 Mio. Einwohner (25,32,33). Die klinische Symptomatik kann weit gefächert oder aber nur auf eine muskuläre Beteiligung begrenzt sein.

1.4. Diagnosesicherung

1.4.1. Elektromyographie, Muskelbiopsie und Histologie

Die Elektromyographie (EMG) ist diagnostisch, obwohl unspezifisch, von hohem Wert, da sich eine typische Trias, bestehend aus polyphasischen, motorischen Potentialen mit positiven scharfen Wellen, Fibrillationspotentialen und spontanen pseudomyotonen Entladungsserien ergibt. Dieses Bild erleichtert die Abgrenzung zu anderen Muskelkrankheiten, ebenso wie von chronischen Denervationsprozessen. Auch bei anderen Myopathien kann sich das EMG mit verkürzten polyphasischen Potentialen motorischer Einheiten myopathisch verändert darstellen. Das Ausmaß der pathologischen Spontanaktivität ist ein Indikator für die Krankheitsaktivität. Gemischt myopathisch und neurogen veränderte Potentiale bei chronischem Verlauf, können Ausdruck von Muskelfaseruntergang und Regeneration sein.

Die wichtigsten Hinweise zur Diagnosesicherung einer Poly-/Dermatomyositis, erhält man durch die histologische Begutachtung einer durch Muskelbiopsie gewonnenen Probe. Die Myositiden besitzen als histologische Hauptgemeinsamkeiten die chronische Inflammation von Lymphozyten und Makrophagen im Muskel, die Fibrose und der Verlust von Muskelfasern durch Nekrose, Phagozytose und hyaline Degeneration von Muskelfasern, aber auch Zeichen von Regeneration von Muskelfasern. In dem entsprechenden Muskel ergibt sich dabei ein Nebeneinander von Degeneration und Regeneration, Nekrosen, Phagozytose und mononukleären interstitiellen Infiltraten. Diese Veränderungen im Sinne einer entzündlichen Parenchymreaktion können nach einer Glukokortikoidtherapie oder im Spätstadium der Erkrankung fehlen.

Muskelbiopsien von PM und IBM zeigen zufällig verteilte nekrotische Fasern und regenerierte Fasern, sowie als weiteres gemeinsames Merkmal endomysiale inflammatorische Infiltrate. Der elektronenmikroskopische Nachweis der IBM, gelingt durch Darstellung von tubulofilamentösen Einschlüssen im Zellkern oder im Zytoplasma (31,34).

Bei der Polymyositis und möglicherweise bei der Inclusion Body Myositis, wird der Krankheitsbeginn durch eine Aktivierung von CD-8 positiven T-Zellen gesehen, die das endomysiale Parenchym erreichen um Muskelantigene, präsentiert von MHC II-komplexen, zu erkennen. Immunhistochemisch kann man bei der Polymyositis

CD8-positive Lymphozyten in den muskulären Infiltraten, sowie eine erhöhte Expression von HLA-Klasse-I-Antigenen auf den Muskelzellen nachweisen (35,36).

Bei der Dermatomyositis ergibt sich eine endomysiale Inflammation und eine Muskelfaserdestruktion durch vorangehende Aktivierung des Komplementsystems und mikrovaskuläre Ablagerungen von C5b-9 und den membranolytischen Attack complex (MAC) auf den endomysialen Kapillaren, die immunreaktive Mikrothromben bilden. Perifaszikuläre und perivaskuläre Infiltrate, als Hinweis auf eine begleitende Vaskulitis, treten bei der Dermatomyositis auf, wobei CD4-positive T-Lymphozyten und Makrophagen im Vordergrund stehen. Es kommt so zur Ausbildung von Vaskulitiden, regionalen Muskelfarkten und perifaszikulären Atrophien, die auf das Vorliegen einer Dermatomyositis in der histologischen Begutachtung hinweisen.

1.4.2. Labordiagnostik

Kennzeichnend ist bei etwa 90% der Patienten mit Poly-oder Dermatomyositis eine erhöhte Kreatinkinase (CK), ein Enzym, das in Muskelfasern vorkommt und bei Erkrankungen und Schädigungen der Muskelfaser unterschiedlicher Genese vermehrt ins Blut abgegeben wird. Bei Poly-und Dermatomyositis kann das Enzym um das Fünf-bis Fünzigfache erhöht sein. Währenddessen ergibt sich bei der Einschlusskörperchen-Myositis eine nur mäßig erhöhte Kreatinkinase (Drei-bis Fünffache). Aber auch nicht an einer Myositis Erkrankte, können erhöhte Muskelenzyme aufweisen. So sind CK, Myoglobin und Aldolase bei Ausdauersportlern erhöht, ohne pathologischen Wert. Auch nach Muskeltraumen, wie Quetschung oder im Rahmen von Infarktgeschehen werden diese Muskelenzyme durch die Zerstörung der Muskelzelle abgegeben. Bei starker Freisetzung nach akuter massiver Zerstörung des Muskels, kann es durch das freigegebene Myoglobin zu einem intrarenalem Nierenversagen (Crush-Niere) kommen. Die Höhe der Kreatinkinase muss nicht mit der Krankheitsschwere korrelieren, vor allem nicht in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung, in denen der Muskel schon nekrotisiert ist und die noch verbleibende Muskelmasse zu gering für eine signifikant erhöhte Freisetzung der Kreatinkinase ist.

Weiterhin kann man bei PM und DM eine Erhöhung von Aldolase und Myoglobin, sowie der bei Zerstörung freigesetzten intrazellulären Enzyme Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transferase (GPT), Laktatdehydrogenase (LDH) und als Entzündungsparameter die gesteigerte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) beobachten, die bei 2/3 der Erkrankten mit IBM keine Erhöhung aufweist (4,24,25,32,37).

Nicht zu vergessen ist der Nachweis von Jo-1 Antikörpern, der bei bis zu 30% der Polymyositis-Erkrankten und 15% bei Dermatomyositis nachweisbar ist, als weitere Möglichkeit der diagnostischen Sicherung. Zusätzlich stehen der Nachweis von Anti-MI-2 und Anti-SRP-Antikörpern zu Verfügung, um einen weiteren Hinweis auf das Vorliegen einer PM zu erlangen. Auch die unspezifischen ANAs können Hinweise für eine rheumatoide Erkrankung liefern.

Zu unterscheiden sind bei den Myositiden vorkommende Autoantikörper in Myositis spezifische Autoantikörper (MSA) und Myositis assoziierte Autoantikörper (MAA).

In einer großen europäischen Studie wurden 417 Patienten aus 11 europäischen Ländern mit Polymyositis (198 Erkrankte), Dermatomyositis (181 Erkrankte) und Einschlusskörperchen-Myositis (38 Erkrankte), zur Bestimmung vom Antikörpern untersucht (18).

1.4.3. Myositis spezifische Autoantikörper

In dieser Studie konnten bei 56% der Erkrankten Autoantikörper nachgewiesen werden, wobei davon 38% Myositis spezifische Antikörper waren. Insgesamt gelang bei 62% der PM-Erkrankten, 54% der DM-Erkrankten sowie 32% der IBM-Erkrankten der Nachweis von Autoantikörpern (38). Im Rahmen einer holländischen Studie mit 125 Patienten, davon 31 mit Dermatomyositis, 41 mit Polymyositis, 28 mit IBM, 19 Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen mit Muskelbeteiligung, 3 mit Myositis assoziierten malignen Erkrankungen und 3 mit IIM, ergaben sich ähnliche Ergebnisse mit Nachweis von MSA bei 32% der Erkrankten (39).

Ein wichtiges Ziel der Myositis-spezifischen Autoantikörper ist die Aminoacyl-d-RNA-Synthetase sowie die nukleäre Helikase. Diese Enzyme sind Bestandteile

der Translation, wobei jedes Enzym die Veresterung von einer Aminosäure katalysiert (40). In dieser holländischen Studie konnte bei 20% der Erkrankten der Anti-Jo-1-Antikörper nachgewiesen werden, während der Anti-MI-2-Antikörper nur bei 6% vorkam (39).

Ein weiterer Myositis spezifischer Antikörper ist der Anti-SRP, der bei 4% der Myositis-Erkrankten in der holländischen Studie nachgewiesen wurde (39). Das SRP-Antigen besteht aus einer 7-SLRNA Untereinheit und 6 Proteinen mit einem spezifischen Molekulargewicht von 9, 14, 19, 54, 68 und 72KDa (41,42).

Tabelle 1 Darstellung des prozentualen Vorkommens von Myositis spezifischen Autoantikörpern (38,39)

Antikörper	Häufigkeit gesamt bei Myositiden (%)	Häufigkeit bei Polymyositis (%)	Häufigkeit bei Dermatomyositis (%)	Häufigkeit bei IBM (%)	Antigenität gegenüber
Anti-Jo-1	18-25	22	16		Histidyl-t- RNA- Synthetase
Anti-MI-2	6-14	9	21	8	MI-2-beta- Untereinheit mit NM- Fragment
Anti-SRP	4-5	10	3		RNA- Polymerase- III- Transkriptase
Anti-t-RNA- Synthetasen -Anti PL12 -Anti EJ -Anti OJ -Anti ISS	ca. 3-6				Alanin Glycin Isoleucin Asparagin

1.4.4. Myositis assoziierte Autoantikörper

Unter den Myositis assoziierten Antikörpern versteht man all diejenigen Antikörper, die nicht spezifisch für Myositis sind, da sie auch bei anderen rheumatischen Erkrankungen ohne Zeichen einer Myositis vorkommen.

Tabelle 2 Darstellung der prozentualen Häufigkeit von Myositis assoziierten Antikörpern bei Autoimmunerkrankungen (38,39)

Anti-körper	Häufigkeit gesamt bei Myositiden (%)	Vorkommen bei PM, DM, IBM isoliert (%)	Vorkommen bei Auto- Immunopathien	Vorkommen bei anderen Erkrankungen	Antigen
Anti-Ro 52	25		SLE Systemische Sklerose (27%)		SS-A1- Antigen
Anti PM/Scl	AntiPM/Scl 100: 6 Anti PM/Scl 75: 3		Sklerodermie 2-3% Overlap-Syndrom 24-50%		Nukleäres 100KDa Auto- antigen
Anti-Mas- Antikörper	2	PM: 3 DM: 1 In IBM: kein Nachweis		Autoimmun- hepatitis Äthyltoxische Rhabdomyolyse	RNA- Bindungs- protein von 42KDa
Anti- U1SnRNP	5-15		Meistens bei Overlapp- Syndromen		RNP- P70KSE
Anti-Ro60	5-15		Assoziiert mit SLE und Sjogren- Syndrom		SS-A- Antigen
Anti-La- Antikörper	5		SLE-10% Sicca-Syndrom		U3-RNA

1.4.5. Nachweis von Autoantikörpern mit Hilfe von Mikroarrays bei rheumatoiden Erkrankungen

In einer anderen Studie erfolgte die Durchführung von Mikroarrays mit Antigenen in unterschiedlichen Konzentrationen zum Nachweis verschiedener Autoantikörper (43). Dabei wurden zur Untersuchung Doppelstrang-DNA und Einzelstrang-DNA-Antigene und Sm-Antigene (Smith-Antigen) verwendet. Ebenso wie Rheumafaktoren und Cyclic Citrullinated Peptide (CCP). Bei PM-Erkrankten wurde zum Nachweis das Jo1 Antigen, bei der Sklerodermie die Topoisomerase I (Scl 70), das Centromer Protein B (CENP-B) beim Crest-Syndrom, sowie die SSA-

52 KDa-Antigene, SSA-60 RDA-Antigene und die SSB-Antigene beim Sjogren-Syndrom verwendet. Weiterhin erfolgte die Untersuchung von Cytokeratin 19 Antigen, von ANAs (antinukleäre Antikörper) und U1SnRNP.

Tabelle 3 Darstellung des prozentualen Vorkommens von Autoantikörpern bei Autoimmunerkrankungen mit Hilfe von Protein-Mikroarrays (43)

Antikörper	Häufigkeit bei Polymyositis (%)	Häufigkeit bei rheumatoider Arthritis (%)	Häufigkeit bei systemischer Sklerose (%)	Häufigkeit bei Sjogren-Syndrom (%)	Häufigkeit bei SLE (%)
SSA-60-Antikörper	66			80	48
Jo-1	71				
Rheumafaktoren		60			
CCP-Antikörper		41			
Ds-DNA-Antikörper		22			42
Scl 70-Antikörper			42		
SSA-52-Antikörper			33	40	54
CENP-B-Antikörper			28	50	
SSB-Antikörper				30	
SS-DNA-Antikörper					49
ANA			26% bei RA Insgesamt zw. 79-100% bei SLE, PM, syst.Sklerose, Sjogren Syndrom		

Ein weiterer Antikörper, der mittels Immunelektrophorese bei Bindegewebserkrankungen 100% nachweisbar war, ist der sogenannte Anti-Ku-Antikörper. In einer 7-Jahresstudie bis 1996 konnte der Antikörper bei 80% nachgewiesen werden. Bei Polymyositis/Sklerodermie Overlap-Syndromen konnten bei 50% der Untersuchten Anti-Ku-Antikörper nachgewiesen werden (44,45,46,47). 80% der Anti-Ku-positiv Erkrankten wiesen Symptome eines Raynaud-Syndroms auf, 86% Arthralgien, 50% Myositiden und 35% Ösophagusmotilitätsstörungen. Auffällig war des Weiteren der hohe ANA-Titer, ohne oder in Kombination mit Anti Ro-Antikörpern und Anti-Ku-Antikörpern (48,49,50,51). Bei Patienten mit amyopathischer Dermatomyositis konnte bei 55% der Untersuchten ein Antikörper gegen das CADM-140KDa-Protein nachgewiesen werden (52,53,54).

Ein weiterer mittels Zell-ELISA darstellbarer Antikörper ist gegen das Peptidylarginin Deiminase 4 (PAD4) gerichtet. 45% der an rheumatoider Arthritis Erkrankten, 23% der Polymyositis/Dermatomyositis Erkrankten und 9% der an Lupus erythematoses Erkrankten, wiesen diesen Antikörper auf (55,56).

1.5. Therapie und Prognose

Eine kausale Therapie der Myositiden hat sich bislang noch nicht etabliert. Die derzeit angewandten medikamentösen Optionen sind empirisch oder basieren auf kleinen klinischen Therapiestudien. Dermatomyositis und Polymyositis werden in der Regel primär mit Kortison-Präparaten behandelt. Hierbei beginnt die Therapie mit 1-2mg/kg Körpergewicht über zwei bis vier Wochen, mit langsamer Reduktion der Dosis entsprechend der Klinik. Die Besserung setzt bei einigen Patienten in Tagen, bei anderen erst nach vier bis sechs Wochen ein. Die zunächst hohe Dosis wird im Verlauf meist nur langsam reduziert (57,58). Zur Beurteilung der Krankheitsaktivität sollte neben laborchemischen Parametern, wie die Abnahme der Kreatinkinase-Werte, auch funktionelle Tests hinzugezogen werden. Dazu zählen neben Tests zur Verbesserung der Muskelkraft, Fragebögen über körperliche Fähigkeiten in Alltagssituationen, sowie Fragen nach Krankheitsmanifestationen außerhalb der Skelettmuskulatur.

Bei einigen Patienten führt aber die Behandlung mit Kortison-Präparaten auch in anhaltend hohen Dosierungen nicht zur Remission. Gelingt es nicht auf Dauer, die Dosis unter die Cushing-Schwelle zu senken, ist in diesen Fällen der Einsatz von Immunsuppressiva (das Immunsystem schwächende Substanzen) zu erwägen. Wichtige Vertreter sind die Zytostatika Azathioprin, Methotrexat als Folsäureantagonist, Cyclophosphamid oder Cyclosporin. Mit Azathioprin in einer Dosierung bis zu 3mg/kg/KG, beginnt man häufig die Kombinationstherapie mit den Kortikoiden. Obwohl der Wirkungseintritt von Methotrexat früher einsetzt, hat es aufgrund seiner höheren Toxizität gegenüber Azathioprin nicht den Vorzug. Die Anfangsdosis beträgt 7,5mg/Woche mit Steigerung nach 3 Wochen um 2,5mg bis zur Zieldosis von 10-25mg/Woche, entsprechend der Klinik. Cyclosporin, ein Inhibitor der T-Zell-Aktivierung, kann in Dosierungen von 2,5-5mg/kg Körpergewicht, entsprechend seines Plasmaspiegels und der Klinik angewandt

werden. Anwendungseinschränkungen stellen Nierenerkrankungen bei Nephrotoxizität, sowie arterieller Hypertonus dar. Neuere Studien erbrachten gute Ergebnisse mit Mycophenolate mofetil bei therapieresistenten Myositiden. In einer Dosierung von 2g/d inhibiert es die Purinsynthese in Lymphozyten (59). Es stellt bereits eine Alternative zu Azathioprin in der Transplantationsmedizin dar. Seine therapeutische Wirksamkeit und Relevanz bei Myositiden müssen weitere Studien klären.

Es gelingt dabei oft eine Remission zu erreichen und die notwendige Glukokortikoiddosis deutlich zu reduzieren (60,61,62). Aufgrund dieser Immunsuppression, kommt es gehäuft zu bakteriellen und viralen Infektionen, besonders im Bereich der Atemwege (Bronchopneumonien), so dass die Prognose insgesamt reduziert ist. Die meisten Erkrankungen können Dank der beschriebenen Therapie günstig beeinflusst werden, mit oft kompletten Remissionen bei den kindlichen Formen und einer insgesamt günstigen Prognose. Weitere neuere Therapieoptionen mit TNF- α -Rezeptor-Antagonisten, wie Infliximab, Adalimumab oder Etanercept, Interferon- β -1a und T-Zell-Signaltransduktion-blockierenden Substanzen, wie Tacrolimus/ FK 506 müssen in ihrer Wirksamkeit erst noch in kontrollierten klinischen Studien evaluiert werden. TNF- α -Rezeptor-Antagonisten können bei weiterem Vorliegen einer aktiven Erkrankung eingesetzt werden, d.h. nach Versagen von zwei konventionellen Basistherapeutika, wovon eines Methotrexat ist, über einen Zeitraum von 6 Monaten in adäquater Dosierung (63,64).

Eine weitere Therapiemöglichkeit stellt die intravenöse Gabe von Immunglobulinen (2g/kg Körpergewicht ein-bis zweimal pro Monat) dar, deren Wirkmechanismus noch unklar ist. Es wird eine Wirkung über antiidiotypische Antikörper in den verabreichten Präparationen vermutet (65,66). In einer offenen Pilotstudie mit Dermatomyositis-Erkrankten, führte die Gabe von B-Zellen-depletierenden monoklonalen Anti-CD20-Antikörpern z.B. Rituximab, bei 6/7 der Patienten zu einer deutlichen Symptommilderung (Levine 2005). Dies konnte durch Darstellung einer signifikanten Besserung der Zytoarchitektur des Muskels, mit Rückgang der abnormen immunpathologischen Parameter in der Muskelbiopsie objektiviert werden (65,66,67,68).

Zu ihrer Wirksamkeit bei Polymyositis existieren im Moment noch keine kontrollierten Studien. Offene Studien erbrachten eine Besserung der muskulären

Kraft (69,70). Als Therapie erster Wahl gegenüber der konventionellen Therapie, ist eine überlegene Wirksamkeit nicht belegt. Bei Versagen der Standardtherapie bzw. Auftreten von nicht tolerierbaren Nebenwirkungen, kann die Gabe von Immunglobulinen versucht werden.

Bei Kindern mit juveniler Dermatomyositis erbrachte die Immunglobulintherapie ein deutliches klinisches Benefit, mit Verbesserung der Muskelkraft und Reduktion der konservativen Therapie. Eine primäre Therapie ist in diesen Fällen in Hinblick auf Nebenwirkungen und Toxizität der konventionellen Therapie zu erwägen.

Im Gegensatz zu Poly- und Dermatomyositis, die in der Regel gut auf die beschriebenen Therapieoptionen ansprechen, ist die sporadische Einschlusskörperchen-Myositis (sIBM) weitgehend therapierefraktär. Eine doppelblinde, placebokontrollierte Cross-over Studie mit 19 s-IBM-Patienten mit dem synthetisch produzierten Androgen Oxandrolon erbrachte bei 16 Patienten eine Steigerung der Muskelkraft, v.a. im Bereich der oberen Extremitäten (57,63). Im Gegensatz dazu konnte bei dem Einsatz von Interferon- β 1a, z.B. Avonex mit 60 μ g/Woche, intramuskulär in einer placebo-kontrollierten Studie mit 30 s-IBM-Patienten, keine signifikante Besserung gegenüber der Placebogruppe ermittelt werden (57,62).

In einer weiteren placebokontrollierten Studie erbrachte die alleinige Gabe von 5-20 mg/Woche Methotrexat bei 44 IBM-Patienten keinerlei Verbesserung gegenüber der Placebogruppe. Es stellte sich aber eine Reduktion der Kreainkinaseaktivität dar (57,62).

Im Gegensatz dazu konnte bei der Gabe von Methotrexat und Anti-Thymocytenglobulin bei 11 s-IBM-Patienten, eine gleichbleibende Muskelkraft gegenüber der Placebogruppe mit Darstellung einer Verschlechterung ermittelt werden. Die Ergebnisse waren aber nicht signifikant (57,62).

Bei der IBM konnte eine Doppelblind-Studie des Friedrich Baur-Institutes mit 22 s-IBM-Patienten im Verlauf eines Jahres eine signifikante Besserung der Fähigkeit das Alltagsgeschehen zu meistern von 11% bei gleichbleibender Muskelkraft nach Gabe von Immunglobulinen erbringen (57). Eine Kombination der Immunglobuline mit Steroiden erbrachte in einer Studie mit 36-IBM-Patienten keine Wirksamkeit (57,62).

Bei den Formen im Rahmen einer malignen Erkrankung, nach der sich die Überlebensrate richtet, besteht die Therapie möglichst in vollständiger Entfernung

des Tumors, in deren Folge in der Regel eine komplette Remission der Poly- und Dermatomyositis auftritt.

1.6. Systemischer Lupus erythematoses

1.6.1. Definition, Pathologie und Epidemiologie des Lupus erythematoses

(3)

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, die durch eine Störung der Immunregulation verursacht wird. Die Immunregulation wird ihrerseits durch eine Kombination von genetischen-, hormonellen Faktoren und Umweltfaktoren beeinflusst.

Die eigentliche Ätiologie ist unbekannt. Eine mögliche Virusinfektion bei genetischer Disposition ist denkbar, die durch eine Störung der Immunregulation zu einer polyklonalen B-Zell Aktivierung mit verstärkter Antikörperproduktion führt (71).

Überwiegend erkranken Frauen zwischen 20 bis 50 Jahren im Verhältnis weiblich:männlich = 10:1 mit einer Prävalenz von 50/100000 (0,05%). Genetische Einflüsse werden vermutet, da 10 % der Patienten Verwandte 1. Grades haben, die ebenfalls an Lupus erythematoses erkrankt sind.

1.6.2. Klinische Erscheinung des Lupus erythematoses nach den Kriterien der American Rheumatism Association (4)

- a) Ein Charakteristikum stellt das Schmetterlingserythem dar, dass sich über Wangen und Nasenrücken ausbreitet mit der Tendenz die Nasolabialfalte auszusparen
- b) Ein weiteres Kriterium ist der diskoide Lupus (hyperkeratotische Effloreszenzen mit anhaftenden Schuppen)
- c) Das Auftreten von Hauteffloreszenzen als ungewöhnliche Reaktion auf Sonnenlichtexposition wird als Photosensibilität bezeichnet

- d) Orale Ulcera, eine nichterosive Arthritis von 2 oder mehreren peripheren Gelenken, eine Serositis im Sinne von Pleuritis oder Perikarditis oder eine Begleitmyositis, die bei bis zu 50% der Erkrankten vorkommt, sind weitere Kriterien
- e) Als Folgen der Nierenbeteiligung (oft Prognose entscheidend) können persistierende Proteinurien vorkommen
- f) Bei einer Beteiligung des zentralen Nervensystemes können Krampfanfälle oder Psychosen, subtile Wesensveränderungen, Kopfschmerzen oder Neuritiden von Hirnnerven oder peripheren Nerven nachweisbar sein
- g) Für eine hämatologische Beteiligung spricht das Vorhandensein einer hämolytischen-und /oder hypochromen Anämie mit Retikulozytose, Leukozytopenie, Lymphozytopenie oder Thrombozytopenie
- h) Immunologische Befunde sind das positive Lupus-Zell-Phänomen oder das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen native Doppelstrang-DNA in erhöhten Titer (pathognomonisch), Antikörper gegen Phospholipide (Cardiolipin), Leukozyten, Thrombozyten sowie zirkulierende Immunkomplexe aus Autoantikörpern und korrespondierenden Antigenen (in Glomerula und an Gefäßwänden)
- i) Antinukleäre Antikörper (ANA) mit Vorhandensein eines erhöhten Titers in der Immunfluoreszenz (Verdünnung 1:80) (71) oder in einen äquivalenten Test, sind ein weiteres Kriterium für das Vorliegen eines SLE

Diese von der American Rheumatism Association (ARA) aufgestellten Kriterien erlauben eine gesicherte Diagnose des SLE mit einer Wahrscheinlichkeit von 96% (4).

Eine gesicherte Diagnose liegt vor, wenn 4 von den oben genannten Kriterien gleichzeitig zutreffen (4).

1.7. Rheumatoide Arthritis und reaktive Arthritis

1.7.1. Definition und Ätiologie der rheumatoiden-und reaktiven Arthritis (4,72,73)

Die rheumatoide Arthritis ist eine entzündliche Systemerkrankung, deren Ätiologie unbekannt ist und die hauptsächlich durch eine chronische Entzündung der Synovia der Gelenkhöhlen charakterisiert ist. Im Gegensatz hierzu treten reaktive Arthritiden nach oder während einer primär extraartikulären bakteriellen Infektion auf. Zu den verursachenden Bakterien zählen neben Yersinien auch Chlamydien, Enterobakterien oder Shigellen, aber auch Borrelien und die Streptokokken der Gruppe A.

Die Erstmanifestation der rheumatoiden Arthritis tritt am häufigsten in der 4. bis 5. Lebensdekade auf, wobei Frauen häufiger betroffen sind (weiblich:männlich = 3:1). Bei einer Erstmanifestation jenseits des 60. Lebensjahres beträgt das Geschlechterverhältnis 50%. Die Prävalenz der Erkrankung liegt bei 0,1 bis 0,5%. Die primäre Ursache der Erkrankung ist unbekannt. Diskutiert wird auch eine Beteiligung von Viren (EBV, Retroviren) und Bakterien (Mykoplasmen, Mykobakterien) als auslösende Faktoren. Des Weiteren spielen vermutlich genetische Faktoren eine Rolle. Die Konkordanz bei eineiigen Zwillingen ist zehnmal höher als bei Zweieiigen (4).

Außerdem besteht eine Assoziation mit den Histokompatibilitäts-Antigen (MHC II) HLA-DR4 und HLA-DR1. Während dessen sind die reaktiven Arthritiden häufig mit HLA-B 27 assoziiert. Auch endokrine geschlechtsspezifische Faktoren werden diskutiert. Ebenso ist über ein vermindertes Auftreten bei Einnahme von oralen Kontrazeptiva berichtet worden. Die charakteristischen Rheumafaktoren sind primär nicht als auslösender Faktor anzusehen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Unterhaltung der chronischen Entzündung, z.B. bei der Aktivierung des Komplementsystems. Ebenso sind T-Lymphozyten, die in hoher Anzahl in der entzündeten Synovialmembran vorkommen, an der Perpetuierung der chronischen Entzündung beteiligt. Monozyten des peripheren Bluts sind bereits voraktiviert und sezernieren Entzündungsfaktoren (74,75,76).

1.7.2. Klinik der rheumatoiden Arthritis nach der Klassifikation der American Rheumatism Association (4,72)

- a) Das Vorhandensein einer Morgensteifigkeit über mehr als 6 Wochen von mehr als 1 Stunde Dauer
- b) Die Arthritis von mehr als 3 Gelenken über einen Zeitraum von mehr als 6 Wochen im Sinne einer Synovialitis mit reversiblen Symptomen wie Schmerzen und Schwellung
- c) Der Befall von Hand-, Fingergrund- und Fingermittegelenken im Sinne einer Arthritis
- d) Diese Arthritiden weisen in der Regel ein symmetrisches Befallsmuster auf
- e) Es kommen subkutane Knoten im Sinne von Rheumaknoten bei 10 bis 20% der Erkrankten vor, die von derber, schmerzloser Konsistenz sein können
- f) Der Nachweis von Rheumafaktoren (Immunglobuline, die an konstanten Fc-Teil von IgG-Antikörpern binden) ist bei ca. 70 bis 90% der Erkrankten gegeben
- g) Der Nachweis von für rheumatoide Arthritis typischen Röntgenveränderungen an den Händen im Sinne von strukturellen Veränderungen bei Gelenkdestruktionen wie Schwanenhals- und Knopflochdeformität ist ein weiteres Kriterium

Die Diagnose gilt als gesichert, wenn 4 von den 7 genannten Kriterien gleichzeitig zutreffen. Die Kriterien 1-4 müssen mindestens für 6 Wochen bestehen.

Des Weiteren können bei 10 bis 20% der Erkrankten Allgemeinsymptome, wie Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Ermüdbarkeit oder Parästhesien auftreten. Das Vorkommen von Vaskulitiden auch innerer Organe und peripherer Nerven ist möglich. Ebenso können Perikarditiden, eine Pleuritis exudativa, Lungenfibrosen sowie ein Sicca-Syndrom, eine Skleritis und Episkleritis vorkommen.

1.7.3. Verlauf und Prognose der rheumatoiden Arthritis

60 bis 70% der Erkrankten zeigen einen schleichenden, schubweise oder rasch zunehmenden Verlauf. 10% der Patienten weisen einen rapid verlaufenden Krankheitsprozess auf mit therapeutisch schwer zu beeinflussender Aktivität und 20% einen intermittierenden Verlauf, mit Perioden subjektiver und objektiver Besserung (4,72,77).

Die Patienten mit chronischer Polyarthritits versterben ca. 10 bis 15 Jahre früher als nicht an rheumatoider Arthritis Erkrankte, vor allem an Herz-Kreislaufkrankungen, bakteriellen Infektionen oder Blutungen bei langfristiger Gabe von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR).

2. Zielsetzung

Ausgehend von der Existenz der autoreaktiven membrangebundenen Antigene auf der Muskelzelle, sollen die eigenen Untersuchungen dazu beitragen, die folgenden Schwerpunkte exakter zu interpretieren:

- 1) Quantitatives Verteilungsmuster der membrangebundenen Proteine bei
 - a) Polymyositis/Dermatomyositis
 - b) anderen Autoimmunopathien
 - c) und gesunden Kontrollen
- 2) Beurteilung der Reaktionsmuster nach der Auftrennung im Westernblot nach erfolgter 2D-Elektrophorese
- 3) Bestimmung von Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten der reaktiven Proteine
- 4) Ermitteln des prozentualen Vorkommens eines spezifisches Oberflächenproteins bei Polymyositis, rheumatoider Arthritis und dem systemischen Lupus erythematoses

Weiterhin sollen im Rahmen der Untersuchungen Erkenntnisse gewonnen werden, ob die Zellmembranpräparation zur Isolierung von Oberflächenproteinen als geeignetes Verfahren zu betrachten ist.

Als weitere Kontrollen dienen neben gesunden Probanden, die nicht an einer Autoimmunerkrankung erkrankt sind, auch Personen mit rheumatoider Arthritis, juveniler-und reaktiver Arthritis und Lupus erythematoses. Diese Erkrankungen, die ebenfalls zu den Autoimmunopathien zählen, sind aufgrund ihrer serologischen Befunde interessant. Hierzu zählen neben den unspezifischen ANAs, die auch bei Polymyositis nachweisbar sind, auch die Rheumafaktoren. Es stellt sich die Frage, ob es trotz der unterschiedlichen klinischen Manifestationen dieser Erkrankungen, Gemeinsamkeiten im Erscheinungsbild der Membranproteine gibt.

Ob es sich hierbei um eine Umverteilung von intrazellulären zu Oberflächenproteinen im Sinne einer allgemeinen Entzündungsreaktion handelt, ob es gemeinsame Antigene gibt oder ob es sich nur um unspezifische Reaktivitäten handelt, soll diese Arbeit versuchen zu klären.

Unser Anliegen ist es, neben einem gemeinsamen Muster der Oberflächenreaktivitäten bei Polymyositis, die sich nach dem Western-Blot darstellen, vielleicht ein oder mehrere Proteine zu isolieren, die in höherer prozentualer Häufigkeit vorkommen.

Ergeben sich solche Proteine bei Polymyositis, wollen wir diese mittels Aminosäuresequenzierung bestimmen lassen, um neue Hinweise im Pathomechanismus der Polymyositis oder sogar neue klinische Marker zu erhalten.

Die bisher bekannten Antikörper, wie der intrazelluläre Jo-1 oder Anti-MI-2 oder Anti-RO-52 oder die unspezifischen ANAs, sind nur bei einem gewissen Prozentsatz der Erkrankten nachweisbar.

Ein weiterer neuer klinisch nachweisbarer Marker, könnte die Diagnose der Polymyositis erleichtern oder sogar Hinweise auf den Pathomechanismus liefern. Ebenso interessiert uns die Frage, ob diese spezifischen Proteine, die sich bei der Polymyositis darstellen lassen, ebenfalls bei den anderen untersuchten Autoimmunerkrankungen darstellbar sind.

Sollten bei diesen Erkrankungen andere prozentual häufig vorkommende spezifische Proteine existieren, könnten diese in weiteren Studien mittels Aminosäuresequenzierung näher charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte/Hilfsmittel

Brutschrank	Funktion line, Heraeus instruments Hanau
Mikroskop	Typ DM/L, GF 12,5x120, Medizintechnik Wetzlar
Sterilwerkbank	Typ Lamina-Flow, Heraeus instruments Hanau
Tischzentrifuge	GS-6, Typ Beckmann, Roth Bielefeld
Zentrifuge	Biofuge 22R, Heraeus labware, Hanau
Zentrifuge	Typ J2-HS , Typ Beckmann, Roth Bielefeld
Ultrazentrifuge	L 70, Typ Beckmann, Roth Bielefeld
Wasserbad	Typ Haake, D1, Fa. UB.TK-Cottbus
Tischwaage	Typ Sartorius basic, Sartorius Göttingen
Multiphor II	Amersham Pharmacia Biotech, Wien
Serologische Glaspipetten (5ml, 10ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin lakes
Konisches Röhrchen (falcon)	Becton Dickinson Labware, Franklin lakes
Zellkulturflaschen (750 ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin lakes
Mikropipetten	Biomed Labordiagnostik Oberschleißheim
Pipetierröhrchen	Biomed Labordiagnostik Oberschleißheim
Schaber	Becton Dickinson Labware, Franklin lakes N
Reagenzglas	Kabe Labortechnik Stuttgart
Glaspotter	Behr-Labor-Technik GmbH Düsseldorf
Wannen	Becton Dickinson Labware, Franklin lakes
Sterile Mikropipettierspitzen	Biozym Diagnostik Oldendorf
Sharp JX - 330 Scanner A4	Sharp AG, Niederlassung München

3.1.2. Biochemische Präparate

Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG Berlin
Penicillin (Verdünnung 1:50)	Biochrom AG Berlin
Streptomycin (Verdünnung 1:50)	Biochrom AG Berlin
Zellkultur-Medium RPMI 1640	Biochrom AG Berlin
Zelllinie TE671	ATCC, Middlesex, UK
Anti-human IgG-Antikörper	Biochrom AG Berlin

3.1.3. Chemikalien

Biotin	Pierce chemicals Schwerte
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-chemicals, Sigma-Aldrich Steinheim
tris-hydroxymethylaminomethan (TRIS)	Sigma-chemicals, Sigma-Aldrich Steinheim
TRIS-HCl,	Sigma-chemicals, Sigma-Aldrich Steinheim
Sachcharose	Merck AG Darmstadt
Acrylamid	Fisher scietific International INC Hampton
Bis-Acrylamid	Fisher Scietific International INC Hampton
Milchpulver (5%)	THC Pharm Frankfurt
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (TWEEN 20%, 0,1%ige Lösung)	Sigma-chemicals, Sigma-Aldrich Steinheim
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (TWEEN 20%, 0,05%ige Lösung)	Sigma-chemicals, Sigma-Aldrich Steinheim
konjugiertes Streptavidin	PFL Fine chemicals Leverkusen
Ethylen-diamin-tetra-essigsäure (EDTA)	Sigma-chemicals, Sigma-Aldrich Steinheim
Nitro-blue-Tetra-zolium (NBT)	PFL Fine chemicals Leverkusen
Alkalische Phosphatase I	Sigma-chemicals, Sigma-Aldrich Steinheim
Alkalische Phosphatase II	Sigma-chemicals, Sigma-Aldrich Steinheim
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- Phosphatase (BCIP)	Sigma-chemicals, Sigma-Aldrich Steinheim
Methanol	Merck AG Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMS)	Sigma-chemicals, Sigma-Aldrich Steinheim
Ethanol	Merck AG Darmstadt
Essigsäure	Merck AG Darmstadt
Deionisiertes Wasser	Sigma-chemicals, Sigma-Aldrich Steinheim
Natriumacetat	PFL Fine chemicals Leverkusen
Glutaraldehyd	Dow Rheinmünster
Natriumthiosulfat	Biochrom Berlin
Silbernitrat	PFL Fine chemicals Leverkusen
Formaldehyd	Merck AG Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck AG Darmstadt
Thimerosal	Sigma-chemicals, Sigma-Aldrich Steinheim
Glycerin	Industrie-Chemikalien Nordheim, Mainz
Harnstoff (7M)	Merck AG Darmstadt
Servalyte IsoDalt	Biotrend Chemikalien Köln
Sorbitol	Merck AG Darmstadt

Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Dow Rheinmünster
Bromphenol Blue	PFL Fine chemicals Leverkusen
IPG-Puffer (IP 4-7, IP 3-10, IP 6-11)	THC Pharm GmbH Frankfurt
Immobiline Drystrip Gels (IP 4-7, IP 3-10, IP 6-11)	Dow Rheinmünster

3.2. Methoden

3.2.1. Patienten und Kontrollen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Seren von 19 Patienten mit PM (50 ± 3 Jahre) und 20 Seren, die die Kontrollgruppe bilden im Western-Blot nach 2D-Gelelektrophorese untersucht. Die Kontrollgruppe ist bestehend aus 6 Seren von Patienten mit RA und gleichzeitiger Muskelbeteiligung (59 ± 8 Jahre), 6 Seren von Patienten mit SLE (45 ± 6 Jahre), 2 Seren von Patienten mit reaktiver Arthritis (35 ± 7), 2 Seren von Patienten mit juveniler Arthritis (15 ± 2 Jahre) und 4 Seren von gesunden Kontrollen (43 ± 4 Jahre).

Die Patientenseren stammten vom Friedrich-Baur-Institut der Ludwig-Maximilian Universität München (Prof. Dr. D. Pongratz), dem Institut für klinische Immunologie und Rheumatologie der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg (Prof. Dr. J. Kalden) und aus der eigenen Klinik (Prof. Dr. F. Hiepe). Die Proben wurden nach Genehmigung durch die zuständigen universitären Ethikkommissionen in EDTA-Serumröhrchen (1-2x 7,5 ml Blut) entnommen. Die Aufklärung der Patienten erfolgte entsprechend den Vorgaben durch die Ethikkommissionen der entsprechenden Universitäten freiwillig in den zuständigen Kliniken vor Ort. Bis zum unmittelbaren Gebrauch wurden die Seren portioniert in 2 ml Cryoröhrchen bei -20°C gelagert.

Die nachfolgenden prinzipiell beschriebenen Arbeitsschritte, erfolgten auf der Grundlage der vorliegenden internen Labor-und Arbeitsvorschriften.

3.2.2. Zellkultur von TE671 Rhabdomyosarkomazellen

Die unter Zugabe von DMS tiefgefrorenen Zellen der Rhabdomyosarkoma-Zelllinie TE671 (Rhabdomyosarkomzellen), wurden bei 37°C schnell aufgetaut, sofort bei 1200g zentrifugiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in 2-3ml RPMI 1640 Medium (5,5g/l NaCl, 5mg/l Phenol, 2g/l NaHCO₃, 25mM HEPES, 0,532g/l N-acetyl-L-alanyl-L-glutamine) mit 10% FCS aufgenommen. Danach wurden 5 x 10⁵ Zellen in jeweils 50ml RPMI mit 10% FCS, nach vorangegangener 30-minütiger Inkubation bei 56°C im Wasserbad und 1% einer Penicillin und Streptomycin-Lösung (Verhältnis 1:1) auf 2 bis 3 große Zellkulturflaschen (750ml) verteilt. Die anschließende Inkubation für 2-4 Tage, bis zum konfluenten Zellwachstum bei 37°C, erfolgte in einem Brutschrank.

Nach diesem Zeitraum wurden die Flaschen aus dem Brutschrank entnommen, das Zellnährmedium mit einer Verfärbung von rot/orange zu hellrosa bei Verbrauch als auch die Zellen selbst mit Ausschluss eines eventuellen Pilzwachstums unter dem Mikroskop bei einer Vergrößerung von 40x begutachtet. Bei intakten Zellkulturbedingungen ohne Nachweis von Pilzen und Bakterien erfolgt der Austausch mit Pipetten und Hinzufügen einer frischen Zellkulturlösung nach o.g. Technik. Um das Risiko von Infektionen mit Bakterien zu vermindern, wurden sämtliche Zellkulturarbeiten unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Antibiose, bestehend aus Penicillin und Streptomycin im Verhältnis 1:1, die dem Nährmedium zugegeben wurde.

Nach mikroskopischem Nachweis des Zellwachstums, bei dem der Boden mit konfluent wachsenden TE671 Zellen bedeckt ist (nach 5 bis 7 Tagen), erfolgt mit der Erneuerung der Nährlösung, die gleichzeitige Aberntung und Verteilung der Zellen auf zusätzliche Flaschen.

Dabei wurde der Boden gleichmäßig abgeschabt. Die sich in Lösung befindlichen Zellen wurden abpipettiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Dieser Vorgang wurde, wie oben beschrieben, solange wiederholt, bis die benötigte Anzahl von Zellen vorlag.

Die notwendige Zellenanzahl lag nach 7 Wiederholungen des oben beschriebenen Prozesses vor.

Die Zentrifugation nach dem Abernten erfolgte in einer Tischzentrifuge für 10min bei 1600U/min. Dieser Schritt wurde mit dem entstandenen und mit PBS-Pufferlösung gereinigtem Überstand noch zweimal wiederholt.

Die erhaltenen Zellen können nun sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C tiefgefroren werden, bis zu einer möglichen erneuten Verwendung.

3.2.3. Zellmembranpräparation modifiziert nach Gates et al (78)

Die mit 4ml TRIS-Puffer versetzten und laut dem oben beschriebenen Verfahren vorbereiteten Zellen, wurden mit einem Glaspotter mechanisch zerkleinert. Die einzelnen homogenisierten Zellbestandteile wurden 10min bei 1700U/min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Mit dem gewonnenen Sediment, das noch Membranen enthielt, wurde der Vorgang der mechanischen Zerkleinerung und Zentrifugation noch einmal wie beschrieben wiederholt.

Die gebildeten Überstände, die die Zellmembranen enthielten, wurden vereinigt und auf Falconröhrchen mit je 5ml verteilt und für 1h bei 33000g zentrifugiert (80). In der Zwischenzeit ist ein Saccharosedichtegradient bestehend aus 40%-iger, 17%-iger und 8,5%-iger Saccharose hergestellt worden. Hierfür verwendete man für die 40% Saccharoselösung 40ml PBS-Puffer mit 16mg Saccharose bzw. 6,8mg Saccharose bei 17% und 3,8mg bei 8,5% Saccharosekonzentration.

Für den Dichtegradienten pipettierte man 2ml der 40%-igen Saccharoselösung in ein Zentrifugenröhrchen und fügte unter Herausbildung von 2 Schichten 2ml von 17%-iger Saccharose hinzu.

Das nach einstündiger Zentrifugation entstandene Sediment, wurde nach Verwerfung des Überstandes, in der 8,5%-igen Saccharose gelöst und auf den schon vorhandenen Gradienten mit Herausbildung von 3 Schichten aufgetragen. Die anschließende Ultrazentrifugation erfolgte bei 200000 g für 1 Stunde.

Die gebildeten Interphasen zwischen 0-8,5%, 8,5 und 17% und 17-40% pipettierte man jeweils einzeln ab und ultrazentrifugierte sie für 1h bei 150000g.

Die Sedimente zwischen 17% und 40%-iger Saccharose mit den gewünschten Zellmembranproteinen wurden ebenso wie die 0-8,5% und 8,5-17% Interphasen, die als Kontrollen dienten, über eine eindimensionale (1D) SDS- oder über eine 2D-Gelelektrophorese im elektrischen Feld nach Ladung und Größe aufgetrennt.

3.2.4. 2D-Elektrophorese

Zunächst wird als erste Dimension die Gießkassette, bestehend aus zwei Glasplatten (B: 12,5cm, L: 26,5cm), einer Gelbondfolie in den Maßen der Glasplatten, einem U-förmigen Gummi ($d = 0,5\text{mm}$) und acht Klammern montiert. Hierzu werden die Glasplatten mit Repel-Silane silikonisiert und anschließend auf einem nivellierten Tisch mit einer geringen Menge Wasserstoffperoxyd bidestilliert benetzt, die Gelbondfolie blasenfrei, bündig zu den Rändern aufgelegt und überschüssiges Wasser abgesogen.

Der U-förmige Gummi wird auf der Gelbondfolie so orientiert, dass die Öffnung des Gummis nach vorn zeigt und die zweite Glasplatte auf dem U-förmigen Gummi aufgelegt und mit Hilfe der Klammern fixiert. In die Gießkassette wird, auf einem Nivelliertisch stehend, die Gellösung mit Hilfe einer Peristaltikpumpe bis ca. 0,5cm unter den oberen Rand eingefüllt und mit ca. 200 μl Isopropanol überschichtet.

Die anschließende Polymerisationsdauer beträgt bei Raumtemperatur ca. 2h. Nach erfolgreicher Polymerisation werden die Glasplatten entfernt und das auf der Gelbondfolie haftende Gel drei mal 10min in Wasserstoffperoxyd bidestilliert gewaschen. Anschließend wird das Gel dann für 20min in 1,5% Glycerin inkubiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

Eine Lagerung des Gels in Folie muss bei -20°C erfolgen.

Nun erfolgt die Rehydratation, in dem die Gelseite, nach unten zeigend, in eine Schale mit Rehydratationslösung, bestehend aus 1ml Ampholyte, 2g Sorbitol, 8,4g Harnstoff und destilliertem Wasser (aufgefüllt bis 20ml) luftblasenfrei in die Lösung eingetaucht wird. Während der 2-stündigen Rehydratation wird das Gel mehrmals aus der Lösung gezogen und anschließend wieder luftblasenfrei eingetaucht. Für die nun folgende isoelektrische Fokussierung, wird 1ml Kerosin auf den Kühlblock einer Multiphor II Kammer pipettiert, das Gel so luftblasenfrei aufgelegt und die überschüssige Rehydratationslösung auf dem Gel vorsichtig mit Filterpapier aufgesogen. 5 μl einer 0,5%-igen Proteinlösung, die zuvor in 7M Harnstoff gelöst wurde, werden auf Filterpapier (Probenapplikator) aufgetragen. Für jede zu analysierende Probe werden zwei Spuren verwendet. Eine Spur wird nach Trennung in der isoelektrischen Fokussierung (IEF entspricht der 1. Dimension)

gefärbt, die andere Spur wird ausgeschnitten und nach Equilibrierung in der zweiten Dimension (SDS) verwendet.

Die Elektroden, deren Abstand zueinander mindestens 9cm betragen soll, werden auf das Gel gelegt. Die Fokussierung verläuft bei 14°C für 2h mit 2000V, 14mA und 14W. Nach 15min werden die Probenapplikatoren entfernt und die isoelektrische Fokussierung fortgesetzt.

Nach Abschluss werden die vorher markierten Trennsuren (Strips) ausgeschnitten. Die dabei gewonnenen isoelektrischen Fokussierungs-Strips können bei -20 bis -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Die prinzipiell beschriebene 2D-Gelelektrophorese erfolgte im Universitätsklinikum Charité, Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, unter der Leitung von Herrn Prof. P. Sinah.

3.2.5. Western-Blot

Beim Westernblot (Immunoblot) werden die Antigene nach Auftrennung in ihre Komponenten durch die 2D-Elektrophorese auf eine Nylonmembran Trägermatrix übertragen.

Nachdem die Blotmembranen für 30sec in eine mit 50ml Methanol enthaltene Wanne überführt wurden, bis sie hyalin-durchscheinend waren, erfolgte der Waschschrift mit PBS-Puffer für 5min in Falconröhrchen. Die PBS-Lösung wurde verworfen und der beschriebene Waschvorgang noch zweimal wiederholt.

Anschließend erfolgte die Blockung bei 20°C für 1h in einer aus PBS + Milchpulver (5%) + 0,1% TWEEN 20% (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) bestehenden Mischung, auf einer Rüttelmaschine.

Nach 1h konnten die Blots in Falconröhrchen überführt werden, wobei jedes Röhrchen je 40ml PBS-Lösung, 0,05% TWEEN 20% und Serum entweder von PM, DM, an SLE-oder an RA-Erkrankten, oder Gesunden in einer Konzentration von 1:50 enthielten.

Nach Inkubation der Blots für 2h bei 20°C mit dem Serum, erfolgte anschließend dreimal der Waschschrift mit PBS-Puffer und 0,1% TWEEN 20% für je 5min in einem Falconröhrchen.

Anschließend konnten die Membranen in einer Wanne mit PBS + 0,05% TWEEN + Anti-human-IgG-Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 für 1 Stunde bei 20°C auf der Rüttelmaschine inkubiert werden, um schließlich je dreimal für je 5min mit PBS und TWEEN 0,1% gereinigt zu werden.

Nach diesem Schritt erfolgte der Waschvorgang der Blots mit 80ml alkalischer Phosphatase I (1 M TRIS, 3M Natriumchlorid, 100 mM Magnesiumchlorid) für 10min, um sie dann in eine Mischung bestehend aus 50ml alkalischer Phosphatase II (100mM TRIS-HCL, 100mM Natriumchlorid, 5mM Magnesiumchlorid) und je 50µl NBT und BCIP zu überführen. Nach ca. 5-10min setzte eine bläuliche Verfärbung ein, die durch Zugabe von 30µl EDTA beendet wurde. Anschließend wurden die gefärbten Blotmembranen mit PBS für 5min gewaschen und dann luftgetrocknet.

3.2.6. Biotinylierung von Zellmembranproteinen

Bei der Biotinylierung macht man sich, um nur intakte Zellmembranproteine zu markieren, die Intaktheit der Zellen aus der durchgeführten Zellkultur zu Nutze. Biotin reagiert dabei mit der NHS-Gruppe der Proteine zu NH₂-Gruppen (pH 7,4), mit den Zellmembranproteinen bei vorhandener >95% Intaktheit und ebenso mit intrazellulären Proteinen bei zerstörten Zellen.

Ein Teil der durch Zellkultur gewonnenen Zellen der TE671 Zelllinie, wurden vor der oben beschriebenen Membranpräparation mit 30ml PBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 bei 1200g für 6min abzentrifugiert. Das gebildete Sediment wurde anschließend 3-mal mit PBS gewaschen.

Zu den so vorbereiteten Zellen wurden 0,5mg Biotin/ml Reaktionsvolumen hinzugefügt und 30min inkubiert. Anschließend wurden die markierten Zellen je dreimal mit je 30ml PBS-Puffer (pH 7,2) gereinigt und für je 6min bei 1700 U/min in einer Heraeus Tischzentrifuge zentrifugiert, um danach in der Membranpräparation weiterverarbeitet zu werden.

3.2.7. Nachweis biotinmarkierter Zellmembranproteine

Nach der erfolgten 2D-Elektrophorese der biotinylierten Proteine wurde ihr Nachweis durch das nachfolgende Verfahren erbracht, um dadurch die methodische Eignung der Membranpräparation beurteilen zu können.

Nach vorangegangener Vorbereitung der Blots in einer mit 100ml Methanol gefüllten Wanne für 30sec, erfolgte der Waschgang in PBS-Pufferlösung für 5min. Nach Überführung der Blots in Falkonröhrchen, wurde der beschriebene Waschvorgang noch zweimal für je 5min wiederholt. Anschließend konnten die Blots für 1h bei 20°C in einer Lösung aus 100ml PBS + 5g Milchpulver 5% und 0,1 ml TWEEN 0,1% auf einer Rüttelmaschine geblockt werden.

Nach diesem Vorgang erfolgte die Inkubation der Blotmembranen in 100ml PBS + 0,05% TWEEN und 1:1000 AP-konjugiertem Streptavidin für 1h bei 20°C. Anschliessend wurden die Blotmembranen dreimal für je 5min mit PBS + 0,1% TWEEN gewaschen. Nachfolgend wurden die Membranen für 10min in alkalische Phosphatase überführt, die aus 1M TRIS (entspricht 100 ml) + 3 M NaCl (entspricht 33,25 ml) und 100 mM MgCl₂ (entspricht 50ml für eine 1000ml Lösung) besteht. Die Färbung erfolgte in 20ml PBS mit jeweils 20µl NBT (Endkonzentration 50mg/ml) und BCIP (Endkonzentration 20mg/ml) gefüllten Wanne und wurde durch Zugabe von 40µl EDTA (50 mM) gestoppt.

Die Blots wurden entnommen, unter fließendem Wasser gereinigt, an der Luft getrocknet und in Alufolie aufbewahrt, um einen Farbverlust zu vermindern.

3.2.8. Proteinfärbung mit Silbernitrat

Nach erfolgter 2D-Elektrophorese wurden die Gele in Plastikschaalen transferiert und über 24h auf der Rüttelmaschine in der Fixierungslösung mit Ethanol 50%, Essigsäure 10% und deionisiertem Wasser 40% geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung durch die Inkubationslösung, bestehend aus 30% Ethanol, 0,5M Natriumacetat, 0,5% Glutaraldehyd und 0,2% Natriumthiosulfat ersetzt. Unter Schwenken erfolgte die Inkubation der Gele für 2h. Es schloss sich dreimal ein Waschgang mit deionisiertem Wasser für jeweils 20min an. Für 20min erfolgte die Färbung in der Silberlösung (0,1% Silbernitrat und 0,01% Formaldehyd).

Anschließend wurden die Gele erneut für 30sec mit deionisiertem Wasser gespült. Daran schloss sich die Entwicklung in einer Mischung aus 3,5% Natriumcarbonat, 0,05mM Natriumthiosulfat und 0,01% Formaldehyd (pH 11,3) an. Je nach gewünschter Intensität verblieben die Blots ca. 10min in dieser Lösung. Durch Überführen der Gele in die EDTA-und Thimerosalösung, wurde die Reaktion gestoppt. Nach 15min Verbleiben in der Stopp-Lösung erfolgte entweder ihre Erneuerung, so dass die Gele hier gelagert werden können oder die Lufttrocknung der gefärbten Gele.

3.2.9. Aminosäuresequenzierung

Die Aminosäuresequenzierung und Auswertung erfolgte nach tryptischen Verdau der ausgestochenen Proteinspots über Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight (MALDI-TOF)-Massenspektrometrie in der Arbeitsgruppe für funktionelle Proteomanalyse unter der Leitung von Frau Dr. M. Schnölzer am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg.

4. Ergebnisse

4.1. Überprüfung der Eignung der Membranpräparation durch Biotinylierung

Ein weiterer Punkt, der untersucht werden sollte, war die Eignung der verwendeten Membranpräparation zur Gewinnung von Zellmembranproteinen. Zur Beantwortung dieser Frage, wurde nach erfolgter Zellkultur und vor der Membranpräparation bei einem Teil der Zellen, die Biotinylierung durchgeführt, bei der man sich um nur intakte Zellmembranproteine zu markieren, die Intaktheit der Zellen aus der Zellkultur zu Nutze gemacht hat. Biotin reagiert dabei mit der NHS-Gruppe der Proteine zu NH_2 -Gruppen, mit den Zellmembranproteinen bei vorhandener Intaktheit und ebenso mit intrazellulären Proteinen bei zerstörten Zellen.

Nach erfolgter 2D-Elektrophorese erfolgte der Biotinnachweis mit Hilfe von konjugiertem Streptavidin-alkalischer Phosphatase und anschließender Färbung, mit Darstellung der biotinmarkierten Proteine in Abbildung 1.

Der Vergleich erfolgte durch Silberfärbung im Gel nach 2D-Elektrophorese der biotinylierten Proteine in Abbildung 2.

Betrachtend fällt auf, dass ein ähnliches Reaktionsmuster nachweisbar ist.

Die Membranpräparation wird somit als geeignetes Verfahren zur Gewinnung von Zellmembranproteinen betrachtet.

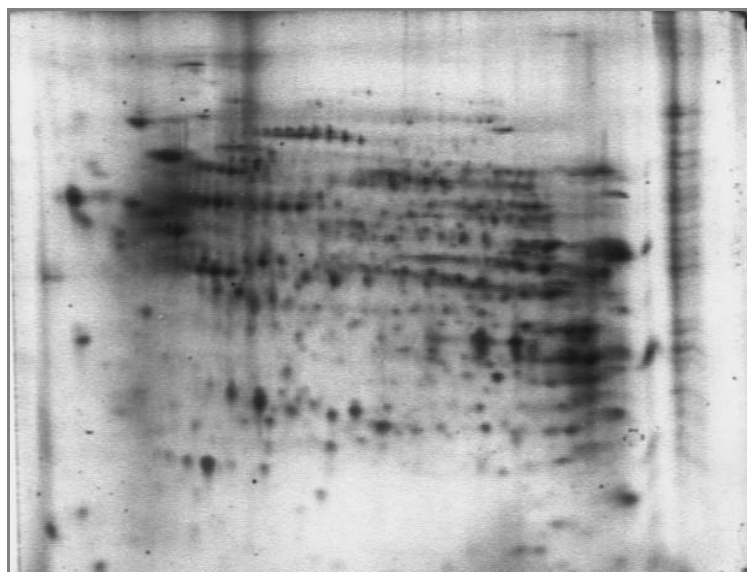


Abbildung 1 Biotin-Nachweis mit Streptavidin-AP auf der 2D-Nylonblotmembran

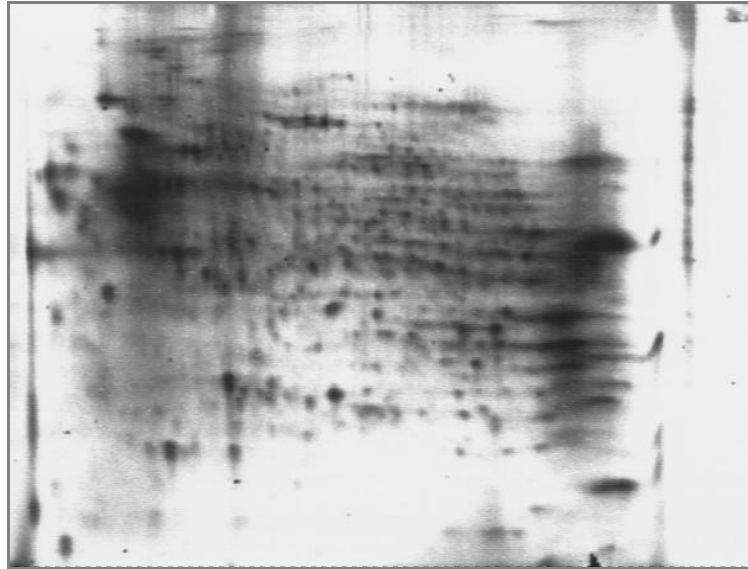


Abbildung 2 Silberrnitratfärbung der biotinylierten Plasmamembranproteine nach der 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

4.2. Darstellung der Gesamtreaktivitäten bei Polymyositis, rheumatoider Arthritis, Lupus erythematodes, juveniler-und reaktiver Arthritis, sowie der gesunden Kontrollgruppe

Der Nachweis der vermuteten Oberflächenproteine nach Membranpräparation und 2D-Elektrophorese, bei der die Proteine in der ersten Dimension nach Ladung und in der zweiten Dimension nach Molekulargewicht aufgetrennt wurden, erfolgte durch den Western-Blot.

Untersucht wurden insgesamt 19 Polymyositis-Seren. Die Kontrollgruppe stellte sich aus 20 Patienten zusammen, wobei 6 SLE-Erkrankte, 6 an RA-und 2 an reaktiver Arthritis-Erkrankte, 4 Gesunde und 2 an juveniler RA-Erkrankte einbezogen wurden.

Die untersuchten Seren stammten vom Friedrich-Baur-Institut der Ludwig-Maximilian Universität München (Prof. Dr. D. Pongratz), dem Institut für klinische Immunologie und Rheumatologie der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg (Prof. Dr. J. Kalden) und aus der eigenen Klinik (Prof. Dr. F. Hiepe). Abbildung 3 stellt die reaktiven Oberflächenproteine bei einem an Polymyositis Erkrankten nach durchgeführtem Western-Blot dar. Hierbei werden die Oberflächenproteine auf der Abszisse nach ihrem pH-Wert und anschließend nach ihrem Molekulargewicht auf der Ordinate zweidimensional aufgetrennt. Es ergab

sich hierbei bei den Einzelnen an Polymyositis und rheumatoider Arthritis Erkrankten das Bild einer starken Reaktivität im Bereich eines mittleren bis höheren Molekulargewichtes von 55-110KDa und einem pH zwischen 4,5-8.

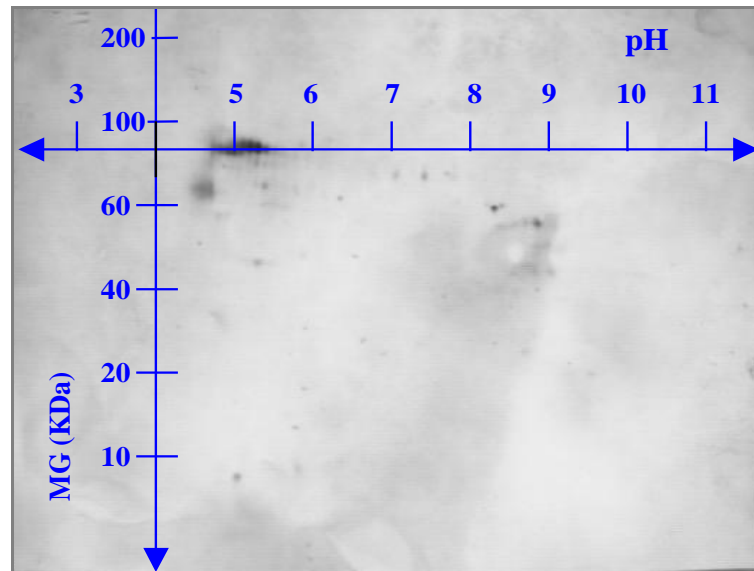


Abbildung 3 Darstellung der reaktiven Oberflächenproteine bei Polymyositis nach erfolgtem Western-Blot und nach vorausgehender Auftrennung in der 2D-Elektrophorese nach pH-Wert auf der Abszisse und Molekulargewicht (MG) in Kilodalton auf der Ordinate

Bei der gesunden Kontrollgruppe zeigen sich in dem Bereich 100-130KDa und einem pH zwischen 8-9 die stärksten Reaktivitäten mit einer verminderten Hintergrundaktivität (Abbildung 4).

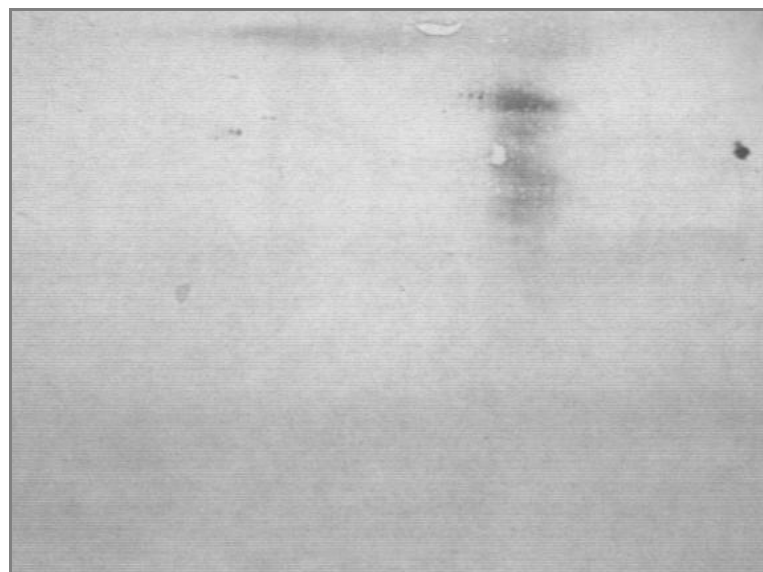


Abbildung 4 Darstellung der reaktiven Oberflächenproteine bei gesunden Kontrollen

Zur besseren Beurteilung der Quantität der reaktiven Membranproteine sowie der Verteilung der nach dem Western-Blot nachweisbaren Oberflächenproteine, erfolgte die Darstellung der Gesamtreaktivitäten der einzelnen Erkrankungen. Es wurden alle reaktiven Proteine der einzelnen Experimente auf einem Gesamtblot zusammengefasst.

Hierfür wurde folgendermaßen vorgegangen:

- a) Auftrennung der Proteine nach ihrem pH-Wert auf der Abszisse
- b) Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf der Ordinate
- c) Koordinative Übertragung der Reaktivitäten der Einzelblots in den Gesamtblot
- d) Verwendetes Grafikprogramm: CorelDraw 8.0

Die Abbildungen 5 bis 11 stellen dabei die zusammengelegten Gesamtreaktivitäten der Oberflächenproteine von Polymyositis, rheumatoider Arthritis, Lupus erythematodes, juveniler-und reaktiver Arthritis dar.

Zum anderen erfolgte nach demselben oben beschriebenen Prinzip die Darstellung aller reaktiven Oberflächenproteine der gesamten Kontrollgruppe, welche die Gesunden, an rheumatoider Arthritis, an Lupus erythematodes und an juveniler-und reaktiver Arthritis Erkrankten umfasste (Abbildung 5). Es ergibt sich das Bild einer starken Reaktivität bei Polymyositis, bei rheumatoider Arthritis und bei Lupus erythematodes. Diese Autoimmunerkrankungen, weisen neben der ausgeprägten Darstellung von Oberflächenproteinen, auch ein, zunächst oberflächlich betrachtet, ähnliches Reaktionsmuster auf.

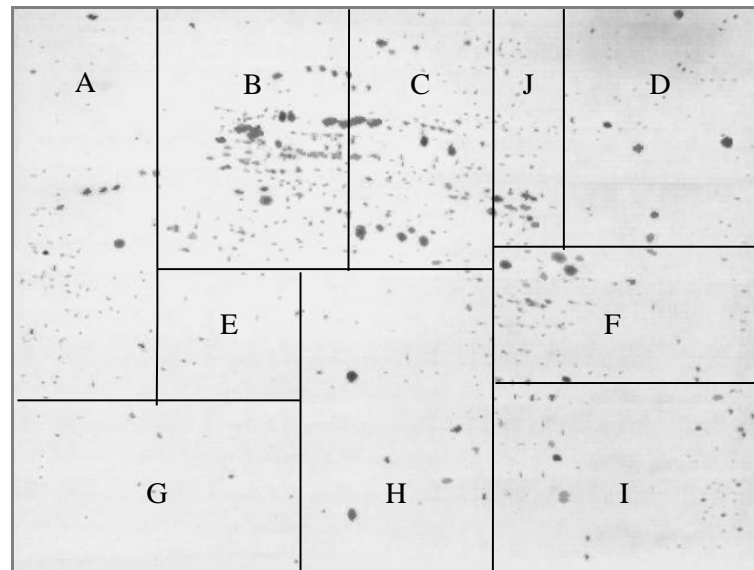


Abbildung 5 Darstellung aller reaktiver Oberflächenproteine der untersuchten Kontrollgruppe, bestehend aus an RA- und SLE-Erkrankten, Gesunden, sowie an reaktiver Arthritis und an juveniler Arthritis Erkrankter

Im Vergleich mit der Polymyositis waren bei der rheumatoiden Arthritis die Bereiche zwischen 55 bis 100KDa (Quadranten B und C) mit einem pH 5-8 mit relativ hoher Reaktivität auffallend. Währenddessen zeigten die Proteine mit kleinem Molekulargewicht zwischen 10-50KDa und einem saurem bis neutralen pH geringe Reaktivitäten, wie in Abbildung 6 mit Darstellung der Gesamtreaktivitäten bei der rheumatoiden Arthritis ersichtlich ist.

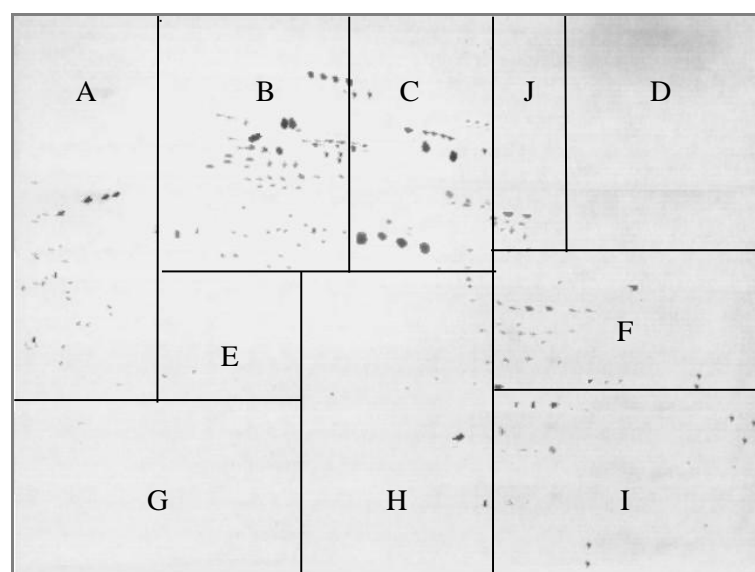


Abbildung 6 Darstellung aller nachweisbaren reaktiven Oberflächenproteine mit Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis

Auch das Reaktionsmuster der Polymyositis stellt sich insgesamt gesehen mit einem vermindertem Vorhandensein reaktiver Oberflächenproteine in dem oben beschriebenen Bereich dar. Bei stark ausgeprägter Gesamtreaktivität fällt ein großer Reaktivitätsbereich zwischen 50-110KDa und einem pH zwischen 4,0-8,0 bei PM auf. Die meisten nachweisbaren Oberflächenproteine scheinen dabei ein mittleres bis höheres Molekulargewicht (60-100KDa), bei saurem bis neutralem pH, nach der Auftrennung in der 2D-Elektrophorese, zu besitzen, was Abbildung 7 veranschaulichen soll.

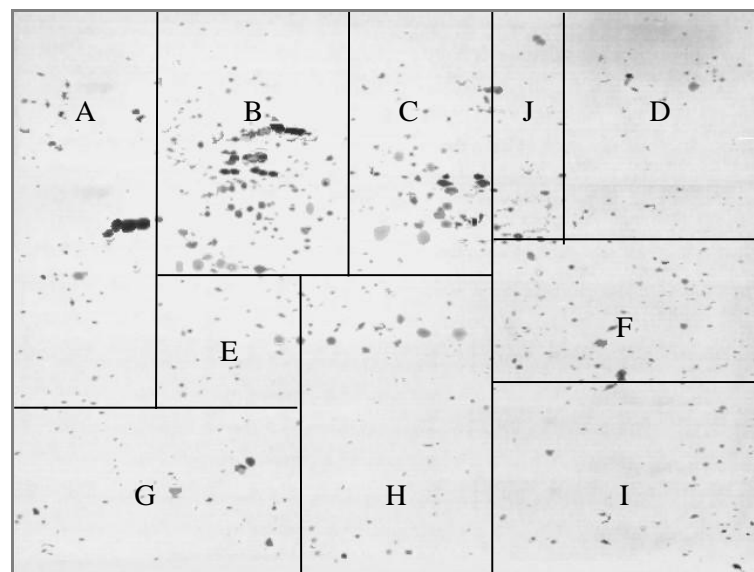


Abbildung 7 Darstellung der gesamten nachweisbaren reaktiven Oberflächenproteine der untersuchten Polymyositis-Erkrankten

Abbildung 8 gibt die Gesamtoberflächenreaktivitäten beim Lupus erythematodes wieder. Hierbei ergibt sich im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine stärkere Aktivität, die aber geringer ausgeprägt ist, als bei der Polymyositis und der rheumatoiden Arthritis. Eine Gemeinsamkeit zwischen Lupus erythematodes, Polymyositis und rheumatoider Arthritis ist der schon beschriebene verminderte Nachweis von Oberflächenproteinen mit geringem Molekulargewicht. Das Reaktivitätsmaximum liegt nach erster Betrachtung, ähnlich wie bei der rheumatoiden Arthritis, bei mittlerem Molekulargewicht und einem neutralen bis schwach basischen pH (Quadranten D und J).

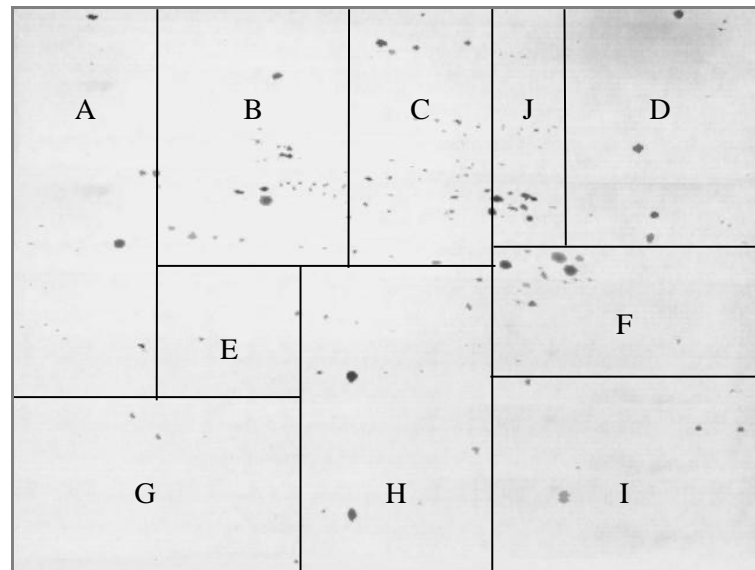


Abbildung 8 Darstellung der Gesamtoberflächenreaktivitäten beim Lupus erythematoses

Andererseits zeigt die gesunde Kontrollgruppe nur geringe Reaktivitäten. Die nachweisbaren reaktiven Membranproteine befinden sich vorwiegend im schwach sauren pH-Bereich mit einem Molekulargewicht von 80-100kDa (Quadranten B und C, Abbildung 9).

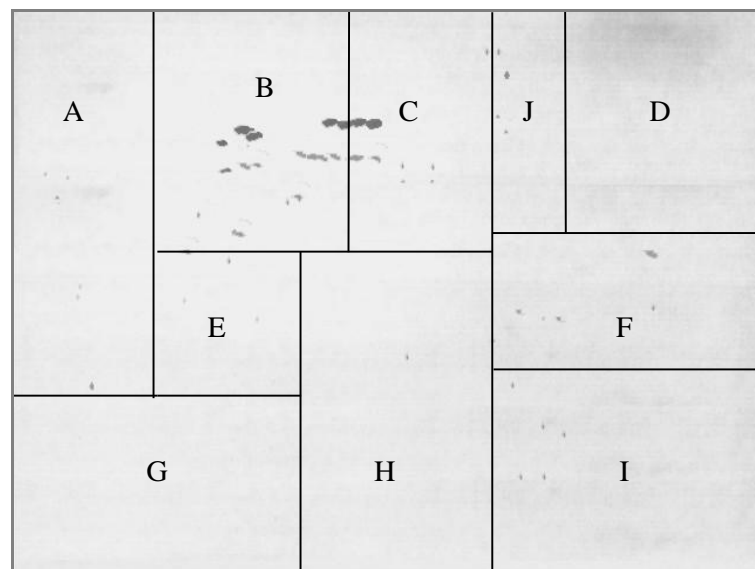


Abbildung 9 Gesamtdarstellung der Oberflächenproteine in der gesunden Kontrollgruppe

Die Reaktivitäten der nachweisbaren Oberflächenproteine bei reaktiver Arthritis und juveniler Arthritis (Abbildungen 10 und 11), sind bei sehr kleiner Fallzahl geringer ausgebildet, im Vergleich zu rheumatoider Arthritis, Lupus erythematodes und Polymyositis. Jedoch mit höherer Gesamtreaktivität als die gesunde Kontrollgruppe. Im Vergleich mit der rheumatoiden Arthritis zeigen sie ein ähnliches Reaktionsmuster, bei der Lokalisation der Bereiche mit höherer (Quadranten B und C) bzw. mit geringer Aktivität (Quadranten E, G und H).

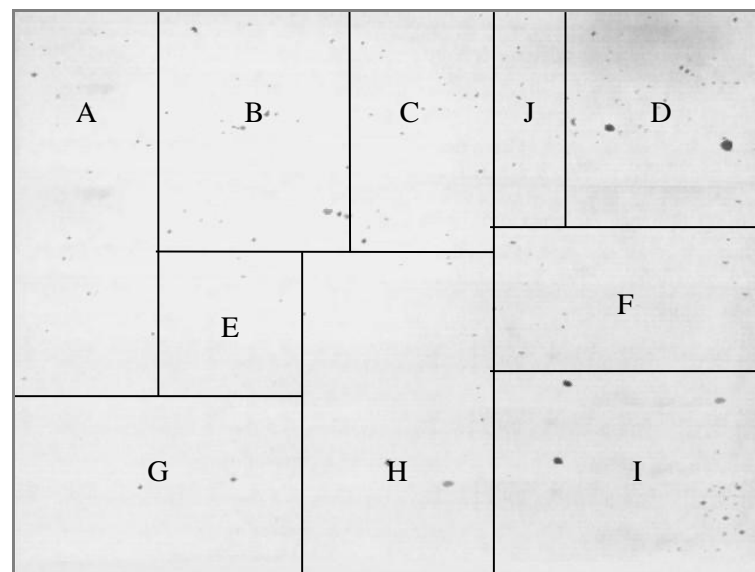


Abbildung 10 Darstellung der Gesamtreaktivitäten bei juveniler Arthritis

Zum Nachweis spezieller Unterschiede in der Aufteilung der nachweisbaren Oberflächenproteine, erfolgte die Einteilung der Blots in die Teilflächen von A bis J. Hierbei werden die Flächen durch die Koordinatenpunkte des Molekulargewichtes von 200 bis 10KDa auf der Ordinate und des pH-Wertes von 3,0-11,0 auf der Abszisse begrenzt (Abbildung 11).

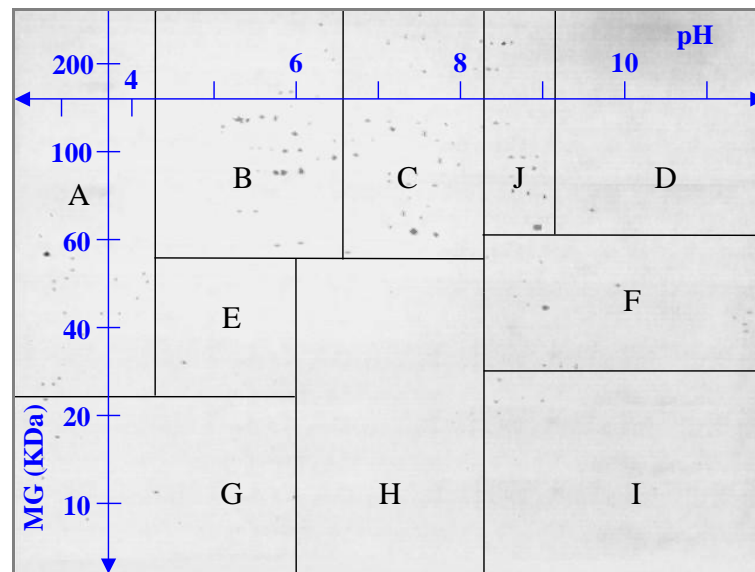


Abbildung 11 Darstellung der gesamten nachweisbaren Oberflächenproteine bei reaktiver Arthritis. Aufteilung des Blots mit seinen Reaktivitäten in die Teilflächen A-J mit Begrenzung der Flächen nach den Koordinaten Molekulargewicht auf der Ordinate und des pH-Wertes auf der Abszisse

Hierbei wurden die Teilflächen wie folgt definiert (grafische Darstellung in Abbildung 11).

Tabelle 4 Koordinative Darstellung der Teilflächen

Bezeichnung der Teilflächen	Ordinate Molekulargewicht (KDa)	Abszisse pH
Teilfläche A	200-25	3,0-4,25
Teilfläche B	200-55	4,25-6,5
Teilfläche C	200-55	6,5-8,25
Teilfläche D	200-65	9,25-11,0
Teilfläche E	55-25	4,25-6,0
Teilfläche F	65-30	8,25-11,0
Teilfläche G	25-0	3,0-6,0
Teilfläche H	55-0	6,0-8,25
Teilfläche I	30-0	8,25-11,0
Teilfläche J	200-65	8,25-9,25

4.3. Verteilungsmuster der Gesamtreaktivitäten in definierten Bereichen bei Polymyositis, Gesunden, rheumatoider Arthritis, Lupus erythematodes und juveniler-und reaktiver Arthritis

In diesen oben beschriebenen definierten Bereichen, erfolgte die Auszählung der Reaktivitäten bei den einzelnen untersuchten Erkrankungen, sowie der gesunden Kontrollgruppe. Die erhaltenen Angaben in den einzelnen Bereichen, wurden in bezug auf die Gesamtreaktivität bei den einzelnen Erkrankungen in Prozent umgewandelt und entsprechend den einzelnen Bereichen in den Abbildungen 12-17 dargestellt. Bei Betrachtung der Blots mit Darstellung der gesamten Reaktivitäten der einzelnen Gruppen, fällt in bezug auf die festgelegten Bereiche insgesamt gesehen auf, dass die Hauptaktivitäten bei fast allen Gruppen in den Bereichen A-C, F und J liegen. In diesen Bereichen befinden sich zwischen 67-88% der Reaktivitäten bei PM, SLE, RA, reaktiver Arthritis und juveniler Arthritis. Im Gegensatz dazu ergaben sich bei den Normalspendern in diesen Bereichen nur Aktivitäten von 53% bezogen auf die Gesamtreaktivität.

Abbildung 12 stellt die Verteilung der Oberflächenreaktivitäten in den einzelnen Flächen, bezogen auf die Gesamtreaktivität bei Polymyositis, dar. Auffällig ist das Maximum der Reaktivitäten bei der Polymyositis in den Bereichen B, C und F mit 52% bezogen auf die Gesamtreaktivität. In den übrigen Bereichen mit Ausnahme von E befinden sich je zwischen 7-10% der nachweisbaren Reaktivitäten.

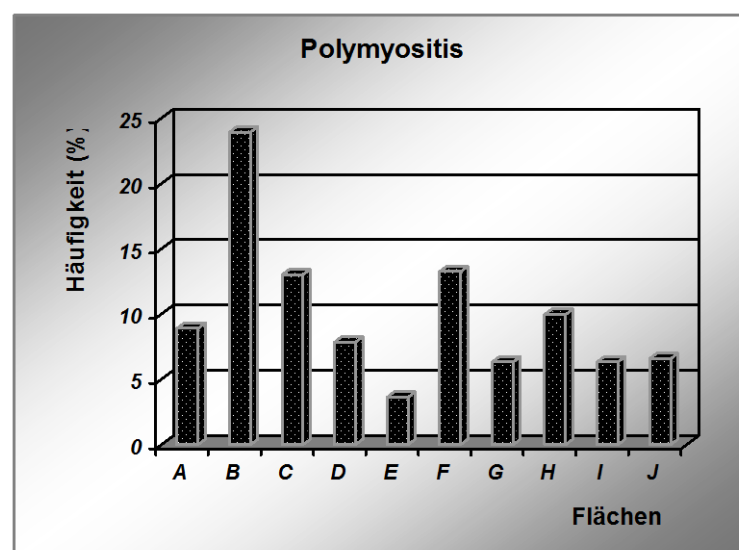


Abbildung 12 Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilflächen bei Polymyositis

Die Abbildungen 13-15 stellen die prozentuale Verteilung der Reaktivitäten der einzelnen Teilflächen, bezogen auf die Gesamtreaktivität bei rheumatoider Arthritis, juveniler-und reaktiver Arthritis dar. Es fällt hierbei ein ähnliches Reaktionsmuster in den Teilbereichen bei rheumatoider Arthritis, sowie trotz geringer Fallzahlen bei reaktiver-und juveniler Arthritis, auf. 72-74% der Reaktivitäten befinden sich in den Bereichen B und C sowie F und J, den Bereichen mit mittleren bis höheren Molekulargewicht bei leicht sauren bis basischen pH. Bei den Arthritiden konnten nur zwischen 15-17% der Reaktivitäten in den Bereichen D sowie den Bereichen mit kleinem Molekulargewicht bei sauren bis basischen pH (G bis I) nachgewiesen werden.

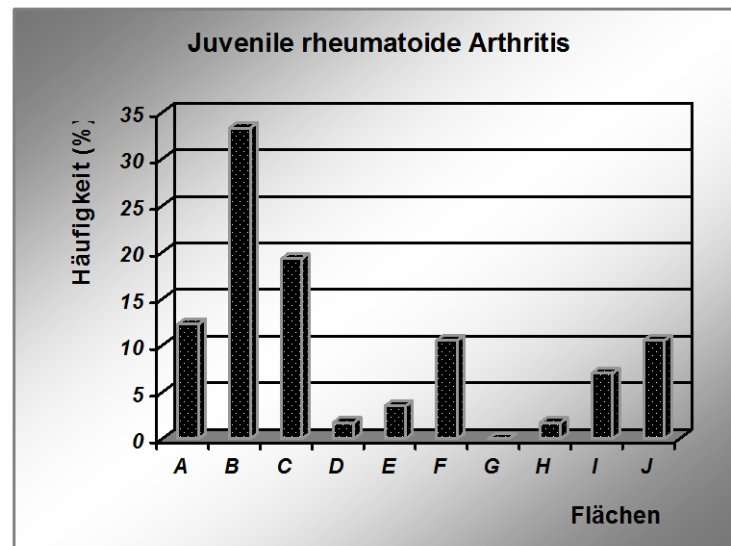


Abbildung 13 Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilflächen bei juveniler Arthritis

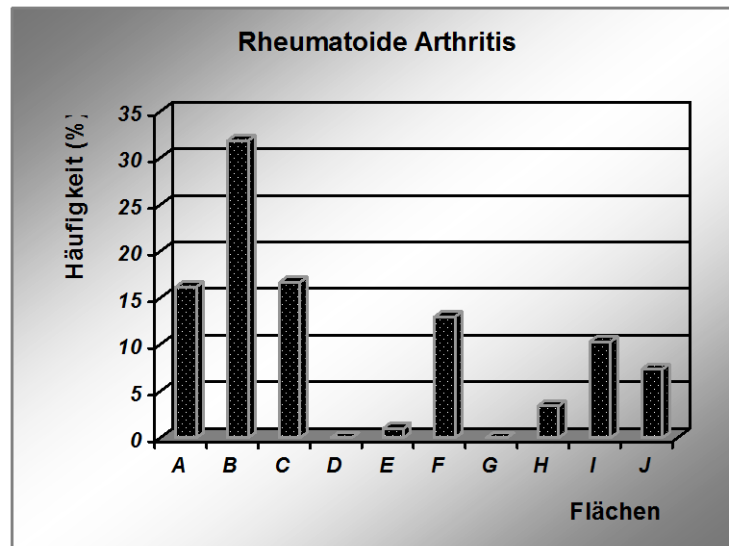


Abbildung 14 Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilflächen bei der rheumatoiden Arthritis

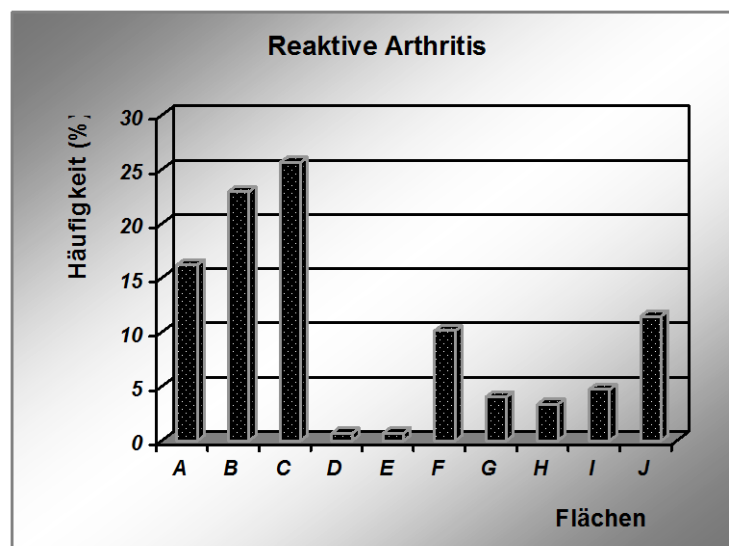


Abbildung 15 Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilflächen bei reaktiver Arthritis

Beim SLE fällt bei Betrachtung der Reaktivitäten, dargestellt in Abbildung 16 auf, dass ähnlich wie bei den anderen Autoimmunerkrankungen, das Reaktivitätsmaximum in den Bereichen mit mittleren bis höheren Molekulargewicht B, C, F und J liegt. Zusätzlich stellt sich eine starke Verteilung von Oberflächenproteinen, anders als bei den Arthritiden, aber ebenso wie bei der Polymyositis, im Bereich mit kleinem Molekulargewicht bei basischen pH (Bereich

H) dar. Ein geringer Nachweis von Oberflächenproteinen mit kleinem Molekulargewicht (12-50KDa) stellt sich grafisch in Abbildung 16 dar. In den entsprechenden Bereichen E, G und I befinden sich nur 5% der Gesamtreaktivitäten, was mit den Befunden der rheumatoiden Arthritiden mit Vorkommen von 10% der Reaktivitäten, in diesen Bereichen annähernd korreliert.

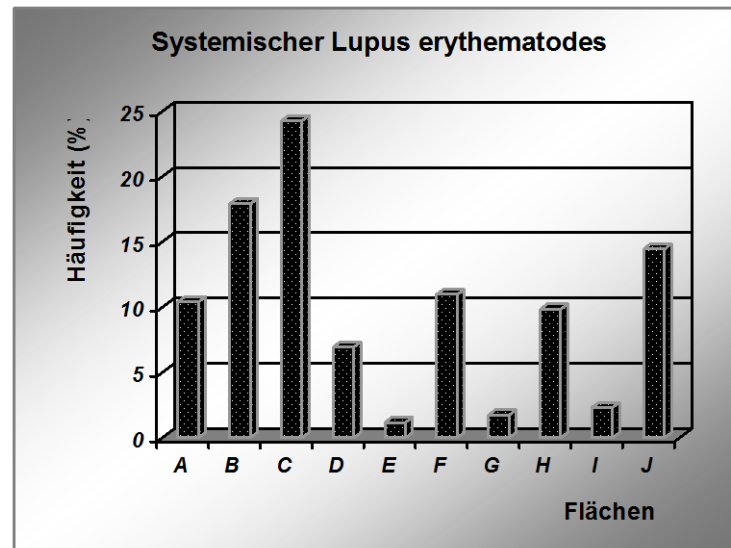


Abbildung 16 Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilflächen bei Lupus erythematoses

Dahingegen fällt in Abbildung 17 mit Darstellung der Reaktivitäten in den einzelnen Bereichen, bezogen auf die Gesamtreaktivität in der gesunden Kontrollgruppe, ein anderes Verteilungsmuster auf. Es befinden sich hierbei die stärksten Reaktivitäten in den Bereichen mit mittlerem bis sehr hohem Molekulargewicht bei basischem pH (Bereiche D und I) mit 43% bezogen auf die Gesamtreaktivitäten. Ein größerer Anteil der nachweisbaren Proteine liegt ähnlich wie bei den untersuchten Autoimmunerkrankungen, in den Bereichen mit einem mittlerem bis höherem Molekulargewicht, aber bei insgesamt bestehender geringerer Hintergrundaktivität im Vergleich zur Polymyositisgruppe. Ähnlich wie die untersuchten Autoimmunerkrankungen mit Ausnahme der Polymyositis, liegen in den Bereichen mit geringem Molekulargewicht und saurem pH (Bereiche E und G), auch bei der gesunden Kontrollgruppe die geringsten Reaktivitäten.

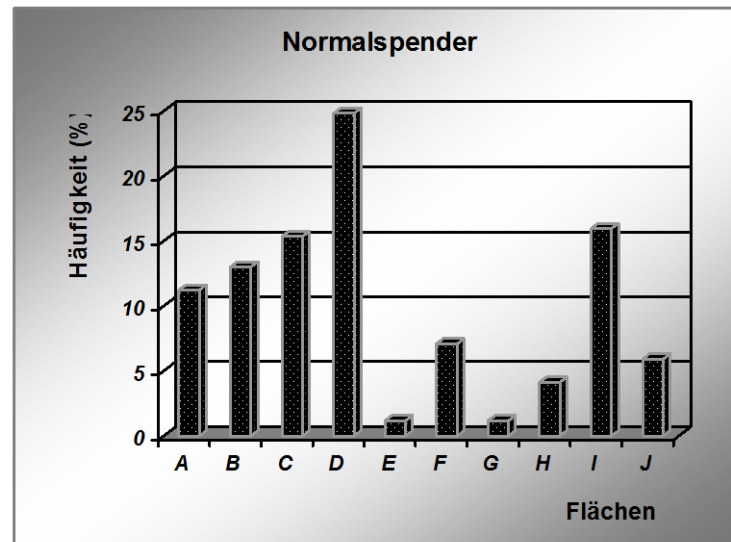


Abbildung 17 Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilflächen bei gesunden Probanden

4.4. Grafische Darstellung der prozentualen Häufigkeit der reaktiven Proteine in den einzelnen Teilbereichen bei Polymyositis, rheumatoider Arthritis, Gesunden, Lupus erythematodes, sowie juveniler-und reaktiver Arthritis

Zur besseren Übersichtlichkeit der Unterschiede in den Reaktivitätshäufigkeiten, erfolgte die Darstellung der prozentualen Häufigkeit der reaktiven Proteine in den einzelnen Flächen bei den untersuchten Gruppen in den Abbildungen 18-23.

Hierbei gibt Abbildung 18 die prozentuale Häufigkeit der reaktiven Proteine bezogen auf die Gesamtreaktivität in Fläche A wieder.

Die untersuchten Arthritiden weisen mit Vorliegen zwischen 12,3-16,2% der Proteine die meisten Reaktivitäten auf. Währenddessen befinden sich nur 8,9% der Proteine bei Polymyositis in diesem Abschnitt. Die SLE-Erkrankten und die gesunde Kontrollgruppe befinden sich mit 10,4% bzw. 11,2% der reaktiven Proteine im Bereich vom geringen bis zum hohen Molekulargewicht bei saurem pH (Bereich A) zwischen den Arthritiden und der Polymyositis.

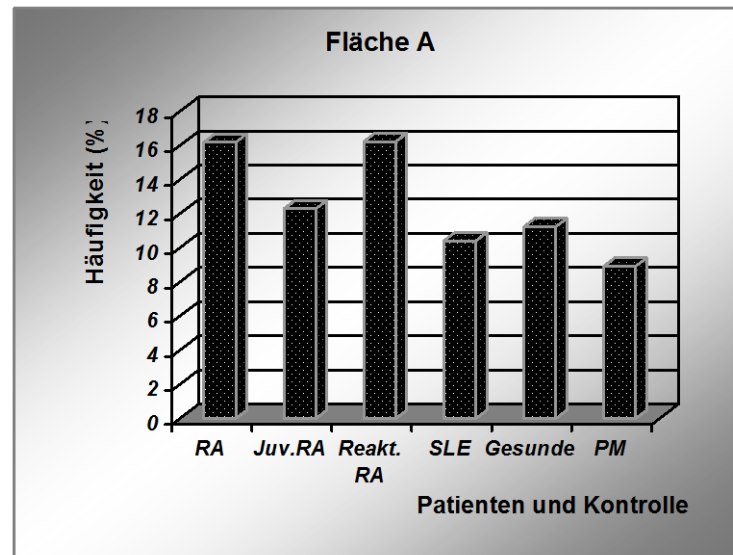


Abbildung 18 Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche A bei den untersuchten Gruppen

Bei Darstellung der prozentualen Häufigkeit der reaktiven Proteine in der Fläche B (Abbildung 19) fällt auf, dass zwischen 23-33% der Reaktivitäten von Polymyositis, rheumatoider Arthritis, sowie juveniler-und reaktiver Arthritis, in diesem Bereich liegen. Dahingegen befinden sich nur 13% bzw. 17,9% der Proteine bei Gesunden bzw. bei an Lupus erythematodes Erkrankten im Bereich eines mittleren bis hohem Molekulargewichtes bei saurem pH (Fläche B).

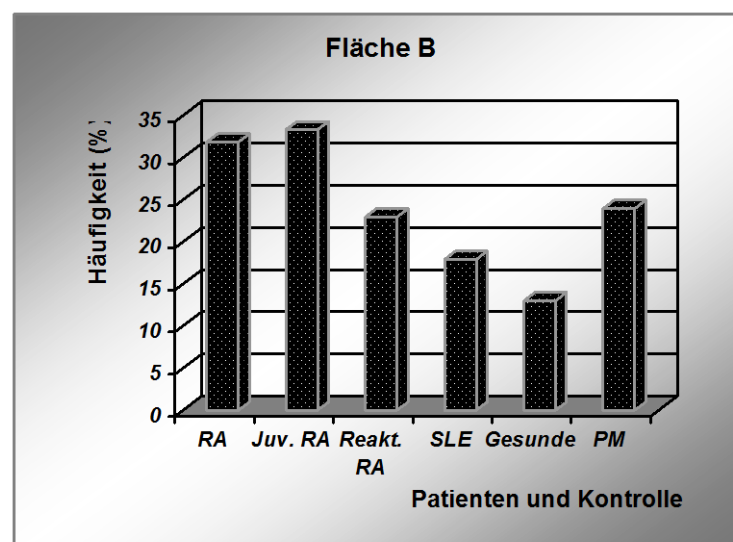


Abbildung 19 Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche B bei den untersuchten Gruppen

Ein ganz anderes Ergebnis ergibt sich bei Auswertung der Reaktivitäten im Bereich D, dargestellt in Abbildung 20. Auffällig ist das überdurchschnittliche Vorkommen von Oberflächenproteinen von 24,85% bezogen auf die Gesamtreaktivität bei Gesunden im Bereich mit mittlerem bis hohem Molekulargewicht und basischem pH (Bereich D). Währenddessen weisen die Autoimmunerkrankungen nur Häufigkeiten ihrer nachweisbaren Reaktivitäten zwischen 0% bei rheumatoider Arthritis und 7,9% bei Polymyositis bezogen auf die Gesamtreaktivität in diesem Abschnitt auf.

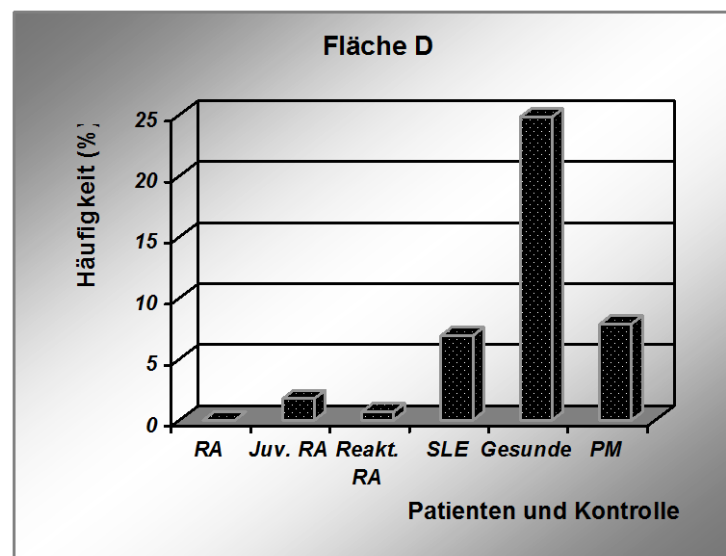


Abbildung 20 Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche D bei den untersuchten Gruppen

Die Abbildungen 21 und 22 sollen die prozentualen Häufigkeiten der Oberflächenreaktivitäten in den Bereichen mit geringem Molekulargewicht bei leicht saurem bis basischem pH (Flächen F und H) bei den einzelnen Erkrankungen, die in der Legende der einzelnen Abbildungen aufgelistet sind, grafisch darstellen. Bei Abbildung 21 ist augenscheinlich ein gleiches Vorkommen von Reaktivitäten im Bereich F bei den Autoimmunerkrankungen zwischen 10,1-13,3% nachweisbar. Die gesunde Kontrollgruppe liegt hierbei mit ca.7% etwas niedriger als die Erkrankungen bei den Proteinen mit geringem Molekulargewicht und basischem pH.

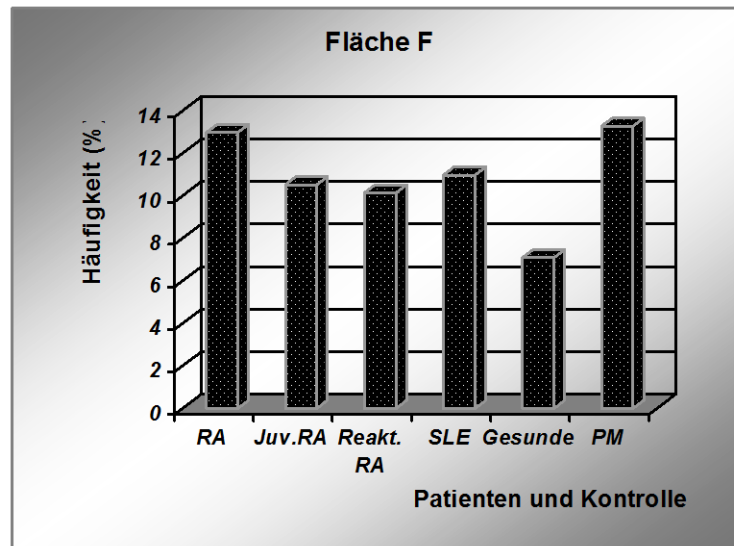


Abbildung 21 Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche F bei den untersuchten Gruppen

Auffällig in Abbildung 22 ist das teilweise sehr geringe Vorkommen von Reaktivitäten zwischen 1,7-ca. 4% im Bereich bei neutralem pH und geringem Molekulargewicht (Bereich H) bei den Gesunden, sowie den drei untersuchten Arthritiden.

Dahingegen befinden sich ca. 10% der Proteine bei Polymyositis und beim Lupus erythematodes in diesem Abschnitt.

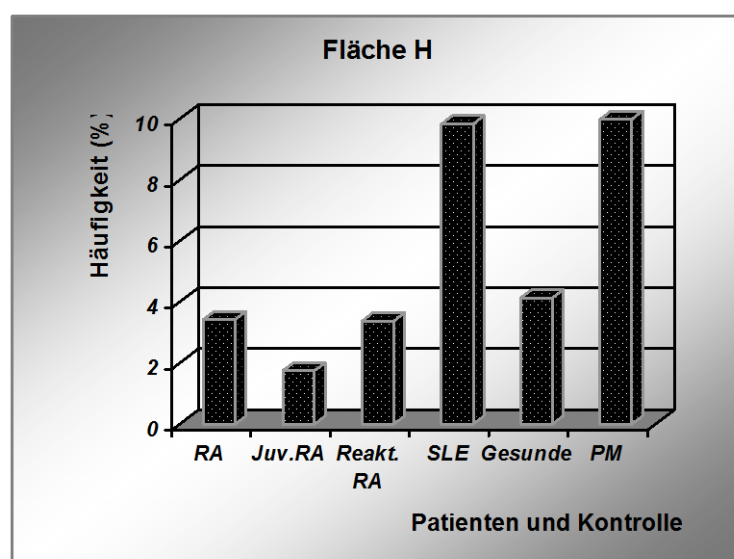


Abbildung 22 Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche H bei den untersuchten Gruppen

Bei dem Vorkommen von Oberflächenproteinen im Bereich I mit sehr geringem Molekulargewicht bei basischem pH, dargestellt in Abbildung 23, ergibt sich, dass ca. 16% der nachweisbaren Proteine bezogen auf die Gesamtreaktivität bei Gesunden sich in diesem Bereich befinden. Die Autoimmunerkrankungen weisen in diesem Abschnitt eine prozentuale Häufung ihrer Oberflächenproteine zwischen 2,3% beim Lupus erythematodes, bis 10,3% bei rheumatoider Arthritis auf.

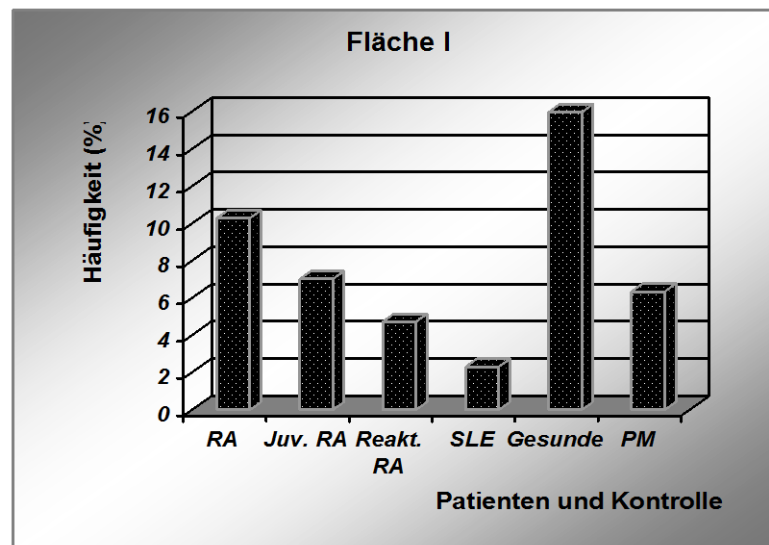


Abbildung 23 Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche I bei den untersuchten Gruppen

Im Bereich J konnten zwischen 5,9-7,3% der Oberflächenproteine, bezogen auf die Gesamtreaktivität bei den Gesunden, bei Polymyositis sowie rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden (Abbildung 24). Die Reaktivitäten beim Lupus erythematodes und der juvenilen-bzw. der reaktiven Arthritis, in dem Bereich mit mittlerem bis hohem Molekulargewicht und leicht basischem pH, war prozentual gesehen bei Werten zwischen 10,5-14,5% deutlich höher.

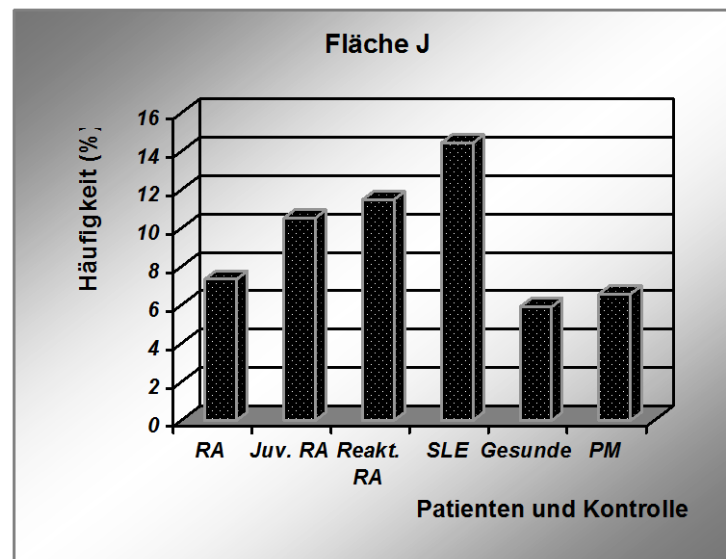


Abbildung 24 Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche J bei den untersuchten Gruppen

4.5. Prozentuale Häufigkeit einzelner spezifischer Oberflächenproteine bei der Polymyositis und der Kontrollgruppe

Weiterhin sollte ermittelt werden, ob es bei den einzelnen untersuchten Erkrankungen und der gesunden Kontrollgruppe, spezifische, nur bei diesen entsprechenden Erkrankungen vorkommende Oberflächenproteine gibt. Die Reaktivitäten wurden entsprechend ihres pH-Wertes und ihres Molekulargewichtes verglichen.

Bei der Polymyositis wurden hierfür die Bereiche mit den stärksten Reaktivitäten in die Teilbereiche A1, B1, B2, C1, C2, H1, H2 und J1 unterteilt, dargestellt in Abbildung 25.

Zur besseren grafischen Veranschaulichung ergibt sich in Abbildung 26 die vergrößerte Darstellung der in Abbildung 25 markierten Teilbereiche.

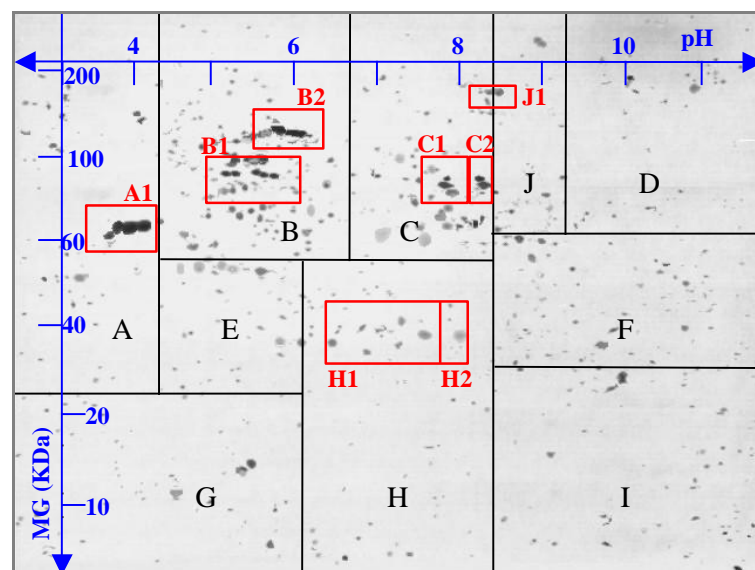


Abbildung 25 Darstellung der Teilflächen A1, B1, B2, C1, C2, H1, H2, J1 der für die weiteren Betrachtungen relevanten Detailbereiche bei der Polymyositis

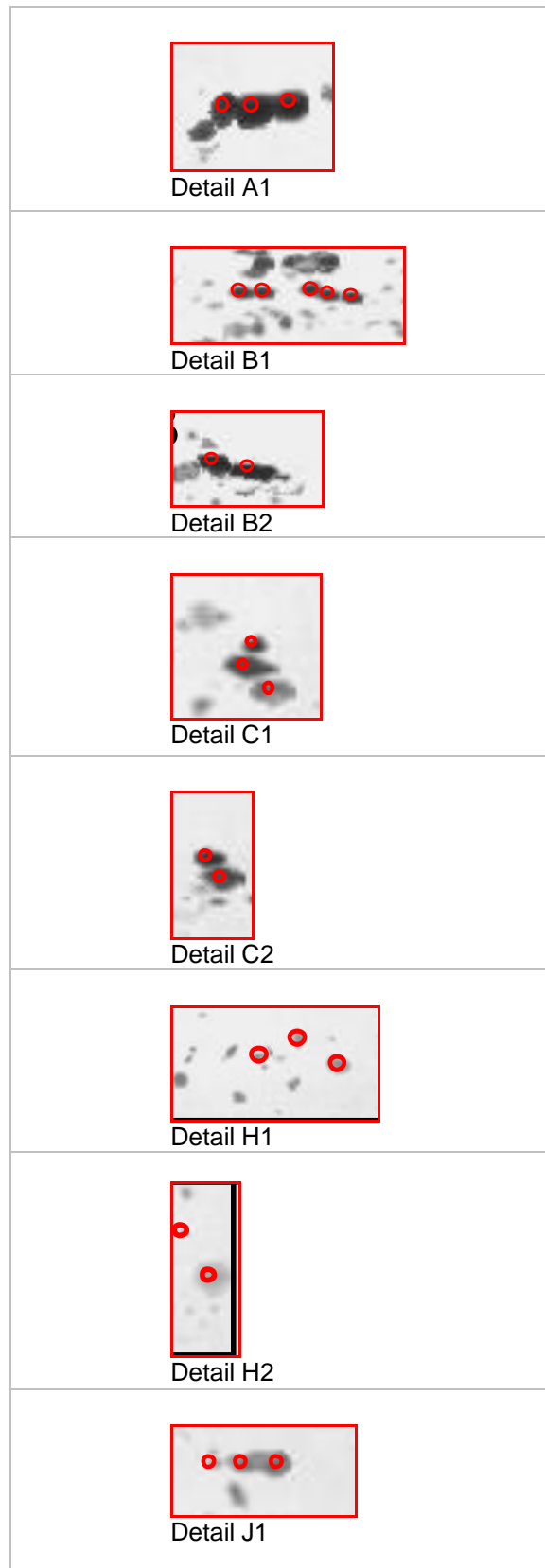


Abbildung 26

Darstellung der vergrößerten relevanten Detailflächenbereiche A1, B1, B2, C1, C2, H1, H2, J1 aus Abbildung 12 bei Polymyositis

Die spezifischen Proteine der in Abbildung 25 markierten Bereiche wurden entsprechend ihres Molekulargewichtes und pH-Wertes ausgezählt und ihr Vorkommen prozentual zur Gesamtzahl der untersuchten Polymyositis Erkrankten in Abbildung 27 dargestellt. Hierbei spiegelt das Säulendiagramm das spezifische Protein definiert durch sein Molekulargewicht auf der Abszisse und des pH-Wertes auf der Ordinate wieder. Die prozentuale Häufigkeit dieses spezifischen Proteins ergibt sich linear zu der sekundären Ordinate.

Die Proteine mit einem Molekulargewicht von 45KDa und einem pH zwischen 6,0 bis 8,0 sowie mit einem Molekulargewicht von 105KDa und pH von 5,5 (entsprechend der Bereiche H1 und B2) bei der Polymyositis konnten bei ca. 32 % der Erkrankten nachgewiesen werden. Im Bereich A1 konnte das dort befindliche Protein mit einem Molekulargewicht von 65KDa und einem pH von 4,5 bei 26% der Polymyositis Erkrankten dargestellt werden. Es folgen mit je 21% der Reaktivitäten die Proteine mit einem Molekulargewicht von 80KDa bzw. 85KDa mit einem pH von 7,5 bzw. 6,0 (entspricht den Bereichen C1 und B1).

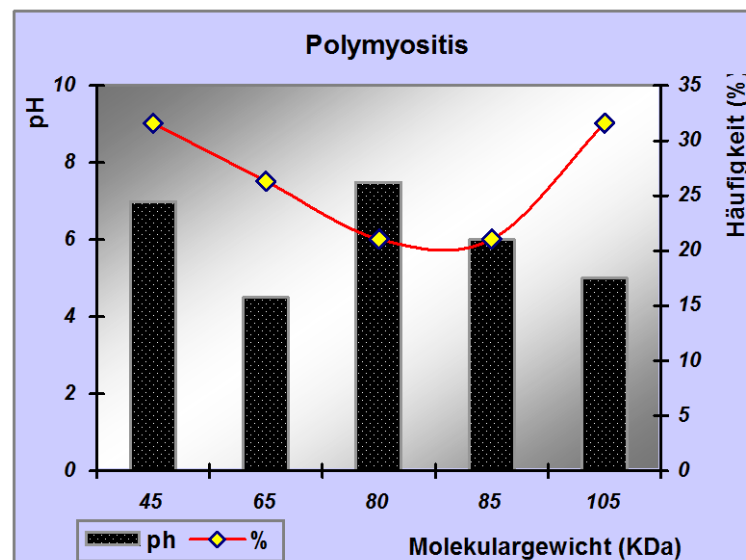


Abbildung 27 Darstellung der spezifischen Proteine als Säulendiagramm mit Molekulargewicht auf der Abszisse und pH-Wert auf der primären Ordinate. Die Häufigkeit des spezifischen Proteins wurde linear zu der sekundären Ordinate aufgetragen

Zum Vergleich wurde neben der gesunden Kontrollgruppe ebenso die rheumatoide Arthritis herangezogen. Auch bei diesen Gruppen wurden die Bereiche mit der stärksten Reaktivität zur besseren Veranschaulichung in den Abbildungen 28 und 29 in farbige Teilbereiche unterteilt. Bei insgesamt deutlich geringerer Gesamtreaktivität in der gesunden Kontrollgruppe, ergeben sich die Proteine in den markierten Bereichen bei geringer Fallzahl ohne auffällige prozentuale Häufung. Hierbei ergibt sich höchstwahrscheinlich mit dem Bereich C1 mit Proteinen eines Molekulargewichtes von ca. 95KDa und einem pH um 6,5-7,0 das entsprechende Korrelat bei der Polymyositis in dem Bereich B2, aber ohne prozentuale Häufung bei den Gesunden. Ebenso ist der Bereich um 85 KDa bei pH um 6,5 (Bereich B2 in Abbildung 28) bei der gesunden Kontrollgruppe bei Polymyositis in dem Bereich B1 (siehe Abbildung 25) wiederzufinden.

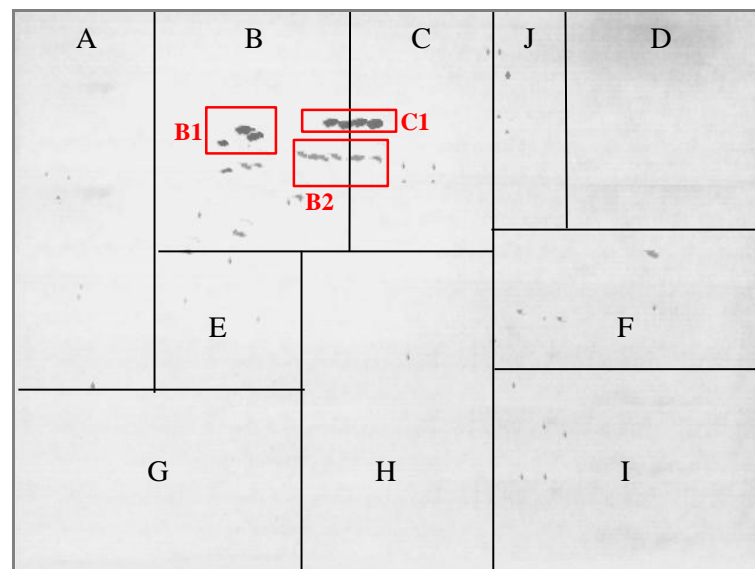


Abbildung 28 Grafische Darstellung der für die weitere Betrachtung relevanten Teilflächen bei der gesunden Kontrollgruppe

Die RA hingegen stellt sich ähnlich wie die PM mit einer ausgeprägten Reaktivität dar.

Es scheint hierbei der Bereich A1 bei der rheumatoiden Arthritis mit Proteinen eines Molekulargewichtes um 70KDa ihr Korrelat in dem entsprechendem Bereich A1 bei der Polymyositis zu finden, aber ohne die prozentuale Häufung im Vorkommen der spezifischen Proteine (Abbildung 29).

Im Gegensatz dazu stellt sich bei der Polymyositis der Bereich um den pH 7,0 und das Molekulargewicht um 60KDa (Bereich C2 bei der RA) nicht dar. Dahingegen scheinen die Bereiche B1 und B2 neben der rheumatoiden Arthritis auch bei der Polymyositis vorzukommen. Im Gegensatz dazu scheint der Bereich C1 bei der rheumatoiden Arthritis kein Korrelat bei Polymyositis Erkrankten zu finden.

Die Bereiche H1, H2 und J1 (Abb. 25) sind augenscheinlich nur bei der Polymyositis, aber nicht bei der gesunden Kontrollgruppe oder der rheumatoiden Arthritis anzutreffen.

Die markierten Abschnitte mit einer ausgeprägten Hintergrundaktivität lassen aber keine relevante prozentuale Häufung erkennen.

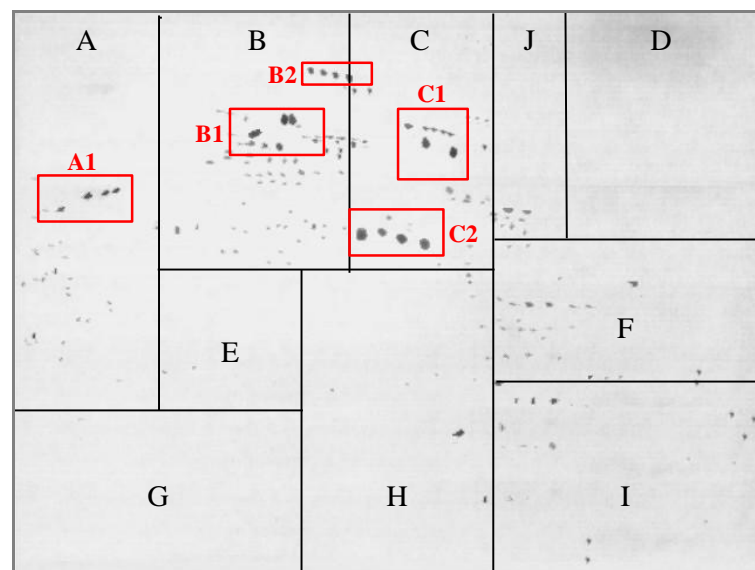


Abbildung 29 Grafische Darstellung der für die weitere Betrachtung relevanten Teilflächen bei rheumatoider Arthritis

Zwei Proteine, die bei der rheumatoiden Arthritis bei 50% der Untersuchten vorgekommen sind, aber ohne starke Hintergrundaktivität einhergehen und deshalb nicht besonders gekennzeichnet wurden, sollen erwähnt werden.

Zum einen handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca.45KDa und einem pH von 3,5. Zum anderen erfolgte der Nachweis eines ca.50KDa Proteins mit einem pH von 9,5.

Des Weiteren ergibt sich noch mit einer prozentualen Häufung von 33% bei rheumatoider Arthritis ein Protein von ca. 10KDa und einem pH von 10,0.

Diese Proteine finden bei der Polymyositis, aber auch bei der gesunden Kontrollgruppe keine Entsprechung. Bei der rheumatoiden Arthritis liegen die Proteine mit einem höheren prozentualen Vorkommen eher in den Bereichen mit einem geringen bis mittlerem Molekulargewicht, im Vergleich zur Polymyositis-Gruppe.

Der systemische Lupus erythematodes besitzt ähnlich wie die rheumatoide Arthritis, die Proteine mit höherem prozentualen Vorkommen in den Bereichen eines kleineren bis mittleren Molekulargewichtes, bei eher neutralen bis basischen pH. Auffallend beim SLE sind zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 55KDa bzw. von 70KDa bei einem pH von 9,0 bzw. von 6,5, die bei 50% der untersuchten Proben nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren ergibt sich noch mit einem Vorkommen von 33% ein Protein mit 60KDa und einem pH von 10,0.

Bei der juvenilen Arthritis und der reaktiven Arthritis ergibt sich bei sehr kleinen untersuchten Gruppen kein Hinweis auf eine mögliche prozentuale Häufung eines spezifischen Proteins.

4.5.1. Charakterisierung der reaktiven Proteinspots durch Aminosäuresequenzierung

Die reaktiven Proteine, die bei der PM auffallend waren, wurden aus dem 2D-Gel ausgestochen und im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg in der Arbeitsgruppe Dr. M. Schnölzer durch Aminosäuresequenzierung charakterisiert. Bei den sequenzierten Proteinen handelt es sich um die prozentual am häufigsten vorkommende Proteine bzw. die Proteine mit der stärksten Hintergrundaktivität bei Polymyositis, die in den Abbildungen 26 und 30 markierten spezifischen Einzelbereichen A1 bis H2 dargestellt sind.

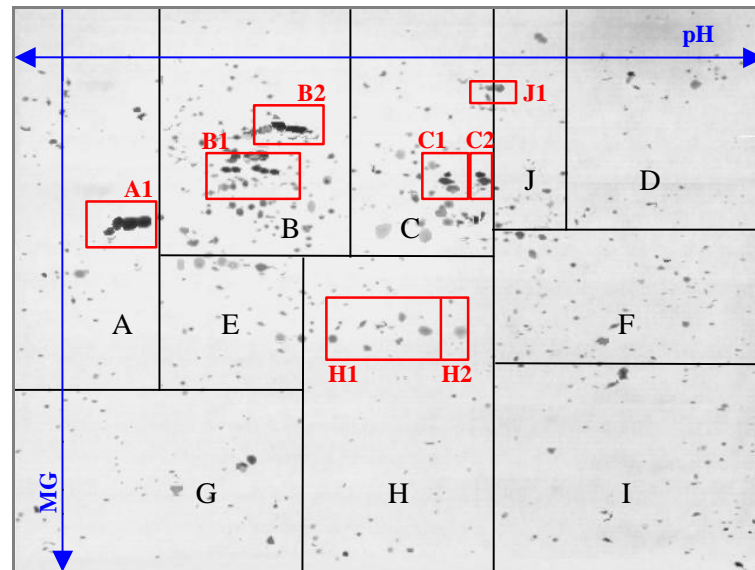


Abbildung 30 Darstellung der relevanten Teilflächen A1, B1, B2, C1, C2, H1, H2, J1 bei der Polymyositis

Hierbei handelt es sich in den Bereichen B1 und B2 um die Chaperonin containing proteine TCP1 mit der subunit 5 mit Molekulargewichten von 74 KDa bzw. 109 KDa. Des Weiteren gelang der Nachweis eines ribosomalen Proteins P0 im Bereich H1 mit einem Molekulargewicht von 34 KDa. Der Bereich J1 umfasst neben dem nonstructural assoziierten Protein (NS1) mit einem Molekulargewicht von 63 KDa auch noch ein Protein von 54 KDa, dass als heterogenous nuclear Ribonucleoprotein L (hnRNP) charakterisiert wurde.

Zusätzlich ergab sich in diesem Bereich noch ein Synaptotagmin bindendes Protein (SYNCRIP) mit einem Molekulargewicht von 71 KDa.

Nachweise von spezifischen Proteinen in den anderen markierten Bereichen gelangen nicht.

5. Diskussion

5.1. Spezifische Oberflächenproteine bei Polymyositis oder rheumatoider Arthritis im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe

Das Wissen über die auslösenden Faktoren der Autoimmunerkrankungen ist noch sehr unvollständig. Man vermutet, dass bei den Myositiden eine Autoimmunreaktion, bei der es über eine Lymphozytenaktivierung zu Muskelnekrosen kommt, eine entscheidende Rolle bei der Genese der Erkrankung spielt.

Das auslösende Agens ist dabei noch unbekannt. Es wird u.a. aber auch auf der Muskelzelloberfläche vermutet und ist so dem immunologischen System zugänglich. Die bisher bekannten Autoantikörper wie Jo-1, der bei bis zu 35% der Polymyositis-Erkrankten nachweisbar ist, ist ebenso wie der unspezifische Autoantikörper ANA hinsichtlich seines Titers ein intrazelluläres Protein.

In den vorausgegangenen Untersuchungen konnte mit einem speziell entwickelten *in situ*-ELISA der Beweis erbracht werden, dass es membrangebundene Antigene auf der Muskelzelle geben muss, die möglicherweise in die Antikörperbindung und Auslösung der Autoimmunität verwickelt sind.

Die Untersuchungen sollten zum einen die Ergebnisse des Zell-ELISA mit Nachweis von Oberflächenproteinen bestätigen und zum anderen die Frage von spezifischen Reaktionsmustern bei den verschiedenen Autoimmunerkrankungen klären.

Beginnend mit der Polymyositis ergeben sich hier bei allen nachweisbaren Oberflächenproteinen nur einige wenige, die eine starke Oberflächenreaktivität und eine höhere Wahrscheinlichkeit des Vorkommens besitzen und die deshalb im weiteren Verlauf durch Aminosäuresequenzierung näher charakterisiert wurden. Besonders zu erwähnen sind hierbei zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 45 KDa und einem pH zwischen 6,0 bis 8,0, sowie mit ca. 105 KDa Molekulargewicht und einem pH von 5,5 (Bereiche H1 und B2), die je bei 32% der untersuchten Polymyositis-Erkrankten vorkommen. Ihre Sequenzierung erbrachte zum einen den Nachweis eines Chaperonin containing TCP1 Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 109 KDa. Zum anderen ergab sich ein ribosomales Protein PO. Das im Bereich B1 befindliche Protein von ca. 85KDa mit einem Vorkommen von 21% bei Polymyositis stellte sich nach erfolgter

Aminosäuresequenzierung ebenfalls als Chaperonin containing TCP1 Protein dar. Die Sequenzierung der Proteine mit 80KDa bzw. 60KDa und einem pH von 7,5 bzw. 4,5 (Bereiche A1 und C1), die zwischen 21% bis 26% bei Polymyositis nachweisbar waren, gelang nicht.

Des Weiteren konnte neben dem non struktural Parvovirusprotein B19 (NSE) auch das heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) sequenziert werden. Beides sind Proteine zwischen 55 KDa bis 63 KDa (Bereich J1).

Obwohl es für eine mögliche virale Genese (Coxsackie, HIV, Parvoviren B19 und Echoviren u.a.) derzeit keine ausreichenden Beweise gibt, könnte der nun erfolgte Nachweis u.a. des non-structural Parvovirusprotein B19 auf der Muskelzellmembran bei Polymyositis, in unseren Untersuchungen diese These stützen. Die Pathogenese der Autoimmunerkrankungen bleibt trotz allem weiter unklar.

Akute Parvoviren B19-Infektionen gehen neben Allgemeinsymptomen wie Fieber und dem charakteristischen Exanthem auch mit dem Bild von Myositiden einher. Es kann dabei der Nachweis einer akuten Parvovirus B19-Infektion serochemisch durch Nachweis von IgM-Antikörpern oder Nachweis des Virus mittels PCR erbracht werden. Der Nachweis von Parvovirus B19 und seinem NSE in einem Muskel gelang einer französischen Gruppe (79), im Rahmen einer erstmalig dokumentierten Dermatomyositis. Ob NSE selbst oder ein über ihn getriggelter Immunmechanismus die Muskelveränderungen auslösen, bleibt unklar. Es gibt Studien, die eine verstärkte Apoptoserate der eukaryoten Zellen durch die Kombination von TNF α und NSE nachgewiesen haben (79,80). Der Nachweis von Antikörpern gegen die VP1-und VP2-Epitope des Parvovirus B19 in 100% der Untersuchten mit hämophiler Arthritis in einer kanadischen Studie, sowie der Nachweis von NSE als Ausdruck einer persistierenden Entzündung, lassen die Mitbeteiligung an dem Immunmechanismus für möglich erscheinen (81). Das NSE-Glykoprotein wird in der infizierten Zelle produziert und stellt einen Co-Faktor für die virale RNA-Replikation dar. Nach seiner Translation im Endoplasmatischen Retikulum, erfolgt sein Transport an die Zelloberfläche. Hier akkumuliert es und verursacht nach der Immunerkennung Zell-Lecks. An bisher uninfizierten Zellen kann das NSE-Protein über Gag-Rezeptoren binden (82). Der nun erfolgte Nachweis von NSE in der Aminosäuresequenzierung bei Polymyositis lässt eine mögliche Beteiligung in der Pathogenese offen. Zu diskutieren bleibt der fehlende

Nachweis dieser Aminosäuresequenz bei der rheumatoiden Arthritis. Es wurden auch bei ihr Parvo B19-DNA in der Synovialmembran in früheren Studien nachgewiesen. Bei sehr kleiner Patientengruppe ist der mögliche Nachweis mit größeren Kollektiven zu wiederholen.

Die Rolle des ebenso nachweisbaren hnRNPs in der Pathogenese der Polymyositis, liegt möglicherweise in einer Interaktion zwischen Zellkern, Zelloberfläche und dem Intrazellularraum. Entsprechend der Molekülmasse unterscheidet man 21 Gruppen von A-U. Neben den Myositiden gelingt ihr Nachweis auch bei Sklerodermie, Psoriasis und Overlap-Syndromen. Es ist bekannt, dass u.a. ANAs mit den hnRNP-Proteinen reagieren (83). Ihre Bedeutung bei der Translation und möglicher Replikation bei viralen Geschehen, u.a. Piconaviren und Flaviviren, wird diskutiert (84). Studien konnten beweisen, dass das hnRNP, welches eigentlich ein intranukleäres Protein darstellt, an das N-terminale Core-Protein des Hepatitis C-Virus, über dessen internal ribosomal entry site (IRES) bindet (84). Sein Vorkommen korreliert direkt mit der Höhe der Translation der Virus m-RNA. Ein weiteres Mitglied der hnRNP Familie stellt das Synaptotagmin-binding, cytoplasmatic-RNA-interacting Protein (SYNCRIP) dar. Es ist ein intrazelluläres cytoplasmatisches Protein, das mit Synaptogagminen, die aus 12 Isoformen bestehen, der Zellmembran assoziiert ist. Das SYNCRIP bindet dabei an die C2B-Domäne über das C-terminale Ende des Synaptotagmins und hat seine Bedeutung durch den Transport von m-RNA, wobei es eine Prävalenz gegenüber poly(A)-RNA besitzt (85). Seine Bedeutung erlangt es durch Stabilisierung der m-RNA. In einer Studie gelang sein Nachweis als Bestandteil der m-RNA-Granula im Hippocampus von Ratten (86). In der bereits zitierten Arbeit, konnte der Transport von SYNCRIP mit einer Geschwindigkeit von 0,05 $\mu\text{m/s}$ vom Zellkörper in den Dendriten, mittels Fluoreszenz nachgewiesen werden (86). Der Transport ist dabei abhängig von Mikrotubuli. Die m-RNA-Granula enthält neben Ribosomen und anderen Komponenten der Translation, auch m-RNA-bindende Proteine wie z.B. hnRNPs, die für die Stabilität und Regulation der Translation verantwortlich sind. Die Interaktion wird durch Bindung an die m-RNA-Granula als Komponenten des Proteinkomplexes vermutet. Das SYNCRIP stabilisiert wie bereits erwähnt, die m-RNA, womöglich auch während des Transportes (86,87). Ob ein solcher Transport von hnRNPs mit m-RNA u.a. von Viren oder bisher unbekanntem Proteinen, die als Antigene fungieren können, über

Mikrotubuli an die Membranoberfläche bei Polymyositis eine entscheidende Rolle spielt, ist bei Nachweis von hnRNPs und SYNCRIP an der Membranoberfläche nach Aminosäuresequenzierung demnach möglich. Denn es ist bekannt, dass es einen auf Vesikel basierenden Transport von m-RNA von dem „Spender“ entlang des Zytoskeletts zum „Empfänger“ mit dort erfolgreicher Fusion der Vesikel mit der Membran gibt (85). Hierfür spricht das ubiquitäre Vorkommen der Isoformen VI-IX des Synaptotagmins (85). Bedeutung erlangt es, Studien zufolge, nicht nur in der Stabilisierung der m-RNA, sondern auch durch die Bindung an die IRES des Core-Proteins des Hepatitis C Virus, wodurch es neben der Erhöhung der Translation auch zur Replikationserhöhung der Virus m-RNA kommt (88). Neben der Bindung an die IRES bei Hepatitis C, binden die Translation-initiation factors (ITAFs), zu denen neben den hnRNPs aber auch die PTBs (polypyrimidine tract binding protein) zählen, an die CAT-1-IRES und lösen somit unter Stressbedingungen wie Hypoxie oder viralen Infektionen, eine Erhöhung der Cat-1-m-RNA Translation aus (89). Diese ITAFs pendeln zwischen Kern und Zytoplasma und spielen anscheinend eine große Rolle in der Translation von m-RNA, da ein Rückgang der Proteinsynthese mit einem Rückgang von hnRNP in der Zelle verbunden ist. Cat-1 (Cationic amino acid transporter) stellt dabei den Transporter für L-Arginin und L-Lysin dar. Neben Stress können auch Wachstumsfaktoren und Hormone die Expression modulieren (89). Eines dieser proinflammatorischen Zytokine stellt das TNF-alpha dar, das als Mediator für Zellproliferation, Differenzierung aber auch Apoptose und Nekrose dient. Die Bedeutung kommt hierbei scheinbar dem s-TNF-alpha zu, welches durch shedding von in der Membran verankerten TNF-alpha entsteht (90). Die Erhöhung der shedding-Aktivität von TNF-alpha zu sTNF-alpha, wird hierbei durch Erhöhung der shedding Proteine, den Metalloproteasen ADAM 10 und TACE oder ADAM 17 (TNF-alpha-converting enzyme) bedingt. Die Regulation dieser Proteasen erfolgt durch sogenannte transcription factors AP1, zu denen Jun B und c-Jun zählen. Diese aktivieren den sogenannten tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3), der wiederum einen Inhibitor der TACE darstellt. So verursacht das Fehlen von JUN B und c-Jun über eine fehlende Inhibierung der TIMP-3, eine steigende TNF-alpha Produktion und somit u.a. Kachexie und Zelltod (90). Es fungieren TACE, aber auch ADAM 10 als Alpha-Secretase und stimulieren die Bildung von APPs alpha (amyloid precursor protein), die man in APLP 1 und 2 einteilt (91). Dem wird eine Bedeutung in der

Entwicklung u.a. von Morbus Alzheimer zugeschrieben. Bei ansteigenden TACE- und ADAM 10-spiegeln, wird auch die Freisetzung von löslichen APLP2 und seines c-terminalen Fragments erhöht. Im Rahmen des Shedding durch u.a. Proteinkinasen C entsteht das neuroprotektive Fragment von APP, das APPs alpha (91). Fehlen APLP 1 und 2 kommt es zu Letalität des Organismus.

Neben ihrem intrazellulären Vorkommen, gab es bereits im Jahre 1994 Hinweise, dass sich die hnRNPs auch in der Zellmembran nachweisen lassen (91). Die Bedeutung dieses Nachweises als Oberflächenprotein, als möglicherweise auslösendes Antigen bzw. als Trigger einer Autoimmunreaktion und ihr Auftreten im Rahmen von Virusinfektionen bei dem Pathomechanismus der Polymyositis, bleibt weiterhin unklar.

Größere Studien müssen neben ihrer Relevanz für den Autoimmunprozess, die gewonnenen Ergebnisse bestätigen.

Ob die Bedeutung von hnRNPs dabei lediglich im Sinne eines Transportproteins u.a. auch für virale RNA, oder zur Stabilisierung der m-RNA während des Transportes an die Membranoberfläche dienen, wo sie von uns mittels Aminosäuresequenzierung nachweisbar waren oder ob sie als auslösendes Antigen gesehen werden können, bleibt offen. Ebenso bleibt zu diskutieren, ob sie durch Mitwirken an sogenannten „shedding-Mechanismen“ von Proteinen, deren Antigenität bedingen oder ob ihr Nachweis als Membranprotein lediglich Ausdruck einer allgemeinen Entzündungsreaktion ist. In wie weit es durch Störung der Regulationsproteine durch antigene Reaktionen zu einer erhöhten Expression von hnRNPs kommt, die ihrerseits eine Erhöhung der Synthese bisher unbekannter Proteine triggern, die in den Pathomechanismus der Myositiden verwickelt sind, bleibt offen. Neben den verschiedenen hnRNPs, die über Aminosäuresequenzierung nachweisbar waren, spielen auch Chaperonine bei der viralen Infektion eine Rolle. Chaperonine sind für das Falten von Proteinen besonders von Aktin und Tubulin im Endoplasmatischem Retikulum notwendig (92,93). Es ist hierbei essentiell für die Ausbildung eines Mitoseapparates.

Ihr späterer Nachweis als Oberflächenprotein bei Polymyositis, aber auch bei der rheumatoiden Arthritis als initial intraplasmatisches Protein, lässt eine Beteiligung am Immunmechanismus möglich erscheinen. Vor allem in Anbetracht des fehlenden Nachweises bei der gesunden Kontrollgruppe.

Ein ähnliches Phänomen ergibt sich bei dem nachgewiesenen ribosomalen Phosphoprotein (PO) der Aminosäuresequenzierung. Dieses eigentlich intrazellulär auf den Ribosomen lokalisierte Protein, das die Translokation von t-RNA katalysiert, konnte mittels Immunofluoreszenz auf der Oberfläche von Neuroblasten, Fibroblasten oder auch Leberzellen nachgewiesen werden (94). Der Antikörpernachweis gegen PO ist bei ca. 10-40% der europäischen Bevölkerung mit SLE mit zentralen Nervensystem-manifestationen (ZNS) möglich. Mittels drei verschiedener Zell-ELISAs, ergab sich eine Übereinstimmung zwischen Nachweis von PO und des Krankheitsaktivitätsscores. Keine Übereinstimmung dahingegen stellte sich zwischen der Höhe der Antikörper und der prozentualen Häufigkeit der ZNS -beteiligungen dar (95). Drei von insgesamt 80 ribosomalen Proteinen wurden mit P0-P2 näher bezeichnet. Sie sind in der großen ribosomalen Untereinheit lokalisiert, binden an ribosomale Proteine und blockieren die Proteinsynthese. Beim SLE, so wurde in Studien berichtet, sollen sie Apoptose auslösen können (95). Als Wirkungsort wird u.a. das limbische System beschrieben, so dass Depressionen häufig beobachtet werden (95). Aufgrund dieser Tatsachen ist nun auch bei der Polymyositis die Rolle von P0 im möglichen Immunmechanismus zu überlegen. Untersuchungen erbrachten, dass der anti-PO-Antikörper mit dem membrangebundenen Liganden des PO-Proteins interagieren kann und nach erfolgter Bindung in die Zelle gelangt. Dort erreicht dieser Komplex den auf den Ribosomen gebundenen P-complex. Bei Mäusen löste dieser Anti-PO-Antikörper-Komplex Apoptose aus (96). Ob es sich dabei nur um die Folge eines Autoimmunmechanismus handelt oder ob dieser durch das PO-Protein und seines Antikörpers getriggert wird, bleibt zunächst offen.

Beim Lupus erythematodes ergaben sich bei kleiner untersuchter Gruppe signifikantere Ergebnisse. Mit einem Vorkommen von 50% beim Lupus erythematodes ergeben sich 2 Proteine. Zum einen ein Protein mit einem Molekulargewicht von 70KDa und einem pH von 6,5 und zum anderen ein Protein von 55KDa und einem pH von 9,0. Außerdem stellt sich mit 33% ein Protein mit 60KDa und einem pH von 10,0 dar. Bei sehr kleinen Fallzahlen, ist ein zufälliger Faktor bei Vorliegen des Ergebnisses nicht sicher ausschließbar. Größere Fallzahlen müssen den Beweis erbringen, ob die entsprechenden Proteine wirklich so signifikant beim Lupus erythematodes vorkommen. Ob sie in ihrem Vorkommen nur Ausdruck einer allgemeinen Entzündungsreaktion sind oder spezifische

Antigene, bleibt zunächst unklar. Erst weitere Studien können Aussagen über ihren Einfluss auf die Pathogenese des Lupus erythematoses erbringen.

Bei der rheumatoiden Arthritis ergeben sich ebenfalls zwei Proteine mit einer prozentualen Häufung von 50%. Dies ist zum einen ein Protein von 45KDa und einem pH von 3,5 sowie zum anderen von 50KDa und einem pH von 9,5. Ein weiteres Protein mit einem Molekulargewicht von 10KDa und einem pH von 10,0 konnte bei 33% der rheumatoiden Arthritis nachgewiesen werden.

Ob es sich bei dem Protein mit einem Molekulargewicht von 45KDa um das ribosomale Protein PO handelt, muss eine Aminosäuresequenzierung ergeben. Auffallend ist bei der rheumatoiden Arthritis, dass die stärksten Oberflächenreaktivitäten nicht mit einer entsprechenden prozentualen Häufung einhergehen. Es handelt sich so am wahrscheinlichsten um unspezifische Reaktivitäten. Weitere Aussagen sind nur nach erneuten Versuchen mit grösseren Gruppen möglich, die das dargestellte Reaktionsmuster und das prozentuale Vorkommen bestätigen. Ähnlich wie bei dem Lupus erythematoses gelten auch hier die bereits erörterten Gegebenheiten. Auffällig ist hingegen, dass die Proteine, die möglicherweise spezifisch für die rheumatoide Arthritis sind und in geringerem Ausmaß für den Lupus erythematoses, ein kleineres Molekulargewicht zu besitzen scheinen, als die ermittelten möglicherweise Polymyositis-spezifischen Proteine. Des Weiteren scheinen die möglicherweise Lupus erythematoses spezifischen Proteine eher im basischen pH-Bereich zu liegen, während bei der Polymyositis sich der pH über die schwach sauren bis schwach basischen Bereiche erstreckt.

Inwieweit die Proteine spezifisch für rheumatoide Arthritis sind oder ob es gemeinsame Proteine mit dem Lupus erythematoses gibt, bleibt ebenso offen, wie die Frage ob ihr Vorkommen im Rahmen einer allgemeinen Entzündungsreaktion oder im Rahmen von Kreuzreaktivitäten, gesehen werden kann. Ebenso ist die Frage nach gemeinsamen Oberflächenreaktivitäten bei rheumatoider Arthritis sowie juveniler-und reaktiver Arthritis noch nicht geklärt. Aussagen über mögliche signifikante gemeinsame Proteine, sind aufgrund der sehr geringen Fallzahlen nicht möglich. Gemeinsamkeiten einzelner Proteine mit Proteinen bei der rheumatoiden Arthritis waren vorhanden. Bei der gesunden Kontrollgruppe fielen keine spezifischen Oberflächenproteine auf.

Über den Einfluss von Kortikoiden auf die Expression dieser spezifischen Oberflächenproteine können derzeit keine Aussagen gemacht werden. Interessant wären weitere Studien, welche die Expression der Oberflächenproteine unter immunsuppressiver Therapie untersuchen. Kommt es zu Änderungen bei bestehender Remission der Erkrankung oder im aktiven Schub, wären weitere Ansatzpunkte folgender Studien mit dem Ziel ein spezifisches Reaktionsmuster und Protein/Antigen zu klassifizieren, um die Diagnostik aber auch die Therapie zu optimieren. Ebenso wie die Klärung des Problems einer möglichen Umverteilung von intrazellulären Proteinen zu Oberflächenproteinen.

5.2. Spezifische Reaktionsmuster bei den untersuchten Autoimmunopathien

Bei den untersuchten Polymyositis-Erkrankten, ebenso wie bei den an rheumatoider Arthritis Erkrankten, stellte sich eine hohe Anzahl von Reaktivitäten dar. Im Gegensatz hierzu ergab sich bei höherer Anzahl an gesunden Spendern im Vergleich zu der geringeren Anzahl an Erkrankten mit reaktiver Arthritis und juveniler Arthritis, eine verminderte Anzahl von Reaktivitäten (Abbildungen 9,10 und 11).

Insgesamt betrachtet ist erkennbar, dass es bei den untersuchten Autoimmunerkrankungen zu einer verstärkten Reaktivität gegen Oberflächenproteine im Rahmen einer allgemeinen Entzündungsreaktion kommt. Ob nur eine erhöhte Expression von Autoantigenen bzw. Antikörpern bei allen untersuchten Autoimmunerkrankungen die Erklärung liefert, bleibt offen. Eine Umverteilung von intrazellulären Proteinen zu erhöhter Darstellung von Oberflächenmembranproteinen im Rahmen des Autoimmungeschehens, ist ebenso denkbar. Ungeklärt bleibt der Einfluss von Kortikoiden und Immunsuppressiva bei den einzelnen Erkrankungen auf die Expression von Oberflächenproteinen.

Ob eine Umverteilung der Oberflächenmembranproteine bei den rheumatoiden Arthritiden bei ihrer Auftrennung nach IP-Wert und Ladung, zu Gunsten zu höheren IP-Werten in der 2D-Gelelektrophorese eine Rolle spielt, bleibt offen.

Auffällig ist, dass sich bei der rheumatoiden Arthritis sowie der juvenilen- und reaktiven Arthritis und beim Lupus erythematoses, zwischen 69-80% der Reaktivitäten in den Bereichen A-C und J, die dem pH zwischen 6,0-10,0 entsprechen, befinden. Bei den Gesunden, aber auch bei der Polymyositis, konnten nur 48-54% der Reaktivitäten in diesen Abschnitten nachgewiesen werden.

Das unterschiedliche Verteilungsmuster bei Gesunden und bei Personen mit rheumatoiden Erkrankungen, trifft nicht spezifisch für Polymyositis zu, sondern in ähnlicher Weise auch für andere Autoimmunerkrankungen.

Zur genaueren Klärung der Genese der verstärkten Oberflächenmembranproteinexpression sind größere Gruppen der einzelnen Erkrankungen notwendig.

Bei Betrachtung der Blots mit Darstellung der gesamten Reaktivitäten der einzelnen Gruppen, fällt in Bezug auf die festgelegten Bereiche auf, dass die Hauptaktivitäten bei fast allen Gruppen in den Bereichen A-C (zwischen 55-200KDa und einem pH zwischen 3-8,5), F (30-65 KDa und pH zwischen 8,25-11,0) und J (65-200KDa und pH zwischen 8,25-9,25) liegen. In diesen Bereichen befinden sich zwischen 67-88% der Reaktivitäten bei Polymyositis, systemischer Lupus erythematoses, rheumatoider Arthritis, reaktiver Arthritis und juveniler Arthritis.

Im Gegensatz dazu, ergeben sich bei den Normalspendern in diesen Bereichen nur Aktivitäten von 53%, bezogen auf die Gesamtanzahl. Anders als bei den Autoimmunerkrankungen, befinden sich die nachweisbaren Proteine bei der gesunden Kontrollgruppe vorwiegend im Bereich eines mittleren Molekulargewichtes zwischen 80-100KDa und einem leicht saurem pH.

Ein zweiter Bereich ergibt sich mit Darstellung einer geringeren Anzahl von Reaktivitäten im Bereich zwischen 20-40KDa und dem pH zwischen 9,0-11,0.

Auffallend bei den untersuchten Autoimmunerkrankungen ist der Bereich bis 55KDa bei einem pH zwischen 3,0-6,0, mit ganz geringer Darstellung von Reaktivitäten. Ob hierbei die schon beschriebene mögliche Umverteilung der Oberflächenmembranproteine bei ihrer Auftrennung nach IP-Wert und Ladung zu Gunsten höherer IP-Werte in der 2D-Elektrophorese eine Rolle spielt, bleibt offen. Dahingegen ergibt sich bei der gesunden Kontrollgruppe in Bezug auf die maximalen Reaktivitäten ein anderes Bild. Es befinden sich hierbei die stärksten

Reaktivitäten in den Bereichen D und J mit 43% bezogen auf die Gesamtreaktivitäten.

Die meisten nachweisbaren Oberflächenproteine besitzen ein geringeres bis mittleres Molekulargewicht, zwischen 80-100KDa und 20-40KDa, im Vergleich zu den Autoimmunerkrankungen, deren Proteine zum größten Teil ein mittleres bis höheres Molekulargewicht aufweisen.

Zusätzlich fällt bei der Auswertung der Reaktivitäten in den einzelnen Teilbereichen ein ähnliches Reaktionsmuster bei rheumatoider Arthritis, sowie trotz geringer Fallzahlen bei reaktiver- und juveniler Arthritis, auf. Sie haben, wie bereits beschrieben, das Verteilungsmaximum der Reaktivitäten in den Bereichen B und C sowie F und J.

Die Polymyositis weist Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede im Reaktionsmuster mit den untersuchten Arthritiden und dem Lupus erythematodes auf. Gemeinsam haben die Autoimmunerkrankungen ihr Maximum an Reaktivitäten in den Bereichen A-C, F und J. Ob es sich hierbei um eine Umverteilung von intrazellulären Proteinen zu erhöhter Darstellung von Oberflächenmembranproteinen im Rahmen eines allgemeinen Entzündungsgeschehens oder um unspezifische Kreuzreaktivitäten handelt, welches die Darstellung von Oberflächenreaktivitäten bei Gesunden erklären könnte, bleibt unklar.

Unterschiede stellen sich in den Bereichen D und G dar. Bei der rheumatoiden Arthritis, der juvenilen- und reaktiven Arthritis, befinden sich in den Bereichen D sowie G-I, nur zwischen 15-17% der Reaktivitäten.

Die Polymyositis verhält sich gegenteilig. In den Bereichen D sowie G-I befanden sich 32% der Reaktivitäten. Anders als die Arthritiden befinden sich ca. 8% der Proteine im Bereich D bei der Polymyositis und damit liegt ein ähnliches Ergebnis wie beim Lupus erythematodes mit ca. 7% der Proteine vor. Der Lupus erythematodes liegt bei Nachweis von 22% der Reaktivitäten, in den Abschnitten D sowie G-I, zwischen der Polymyositis und den Arthritiden.

Ganz anders dagegen verhalten sich die gesunden Kontrollspender mit Nachweis von 49% der Reaktivitäten in diesen Bereichen. Allein 25% der Reaktivitäten entfallen hierbei auf den Bereich D, der die Proteine zwischen 65-200KDa bei einem pH zwischen 9,0-11,0 umfasst. Bereiche wie bei der rheumatoiden Arthritis

oder juveniler Arthritis ohne Reaktivitäten, stellten sich bei der Polymyositis nicht dar.

Im Bereich E, der den Bereich des Molekulargewichtes zwischen 25-55KDa umfasst, liegen bei allen untersuchten Erkrankungen, aber auch in der Kontrollgruppe, weniger als 5% der Reaktivitäten bezogen auf die Gesamtaktivität. Bei den drei untersuchten Arthritiden konnten bei Nachweis von 14-17% der Reaktivitäten im Bereich A ähnliche Ergebnisse dargestellt werden.

Dahingegen befanden sich nur 8% der Reaktivitäten bei Polymyositis in diesem Bereich. Die dargestellten Proteine bei der gesunden Kontrollgruppe und bei Lupus erythematoses, befanden sich mit 10% und 12% zwischen den Werten der Polymyositis und denen der Arthritiden.

Die Genese der bestehenden Unterschiede in der Ausbildung der Reaktivitäten bleibt unklar. Ob es sich hierbei um wirkliche Antigene/Antikörper handelt oder ob es sich um spezifische Eigenschaften der einzelnen Erkrankungen handelt, müssen größere Studien klären.

Derzeitig ergibt sich aus den bestehenden Oberflächenreaktivitäten, trotz bestehender Gemeinsamkeiten und Unterschiede, kein spezifisches Bild für die Diagnose einer bestimmten Autoimmunerkrankung.

6. Zusammenfassung

Über die primären pathogenetischen Faktoren, die an der Entstehung von Polymyositis, rheumatoider Arthritis und systemischen Lupus erythematodes mit beteiligt sind, herrscht noch Unklarheit. Neben genetischen, werden auch hormonelle Faktoren in Betracht gezogen. Eine virale oder bakterielle Genese ist ebenso denkbar. Unbestritten ist, dass sich bei diesen drei genannten Erkrankungen das Immunsystem gegen den Körper richtet. Es kommt zu perivaskulären Infiltraten, die zu Thromben und Muskelnekrosen bei der Polymyositis führen. Auch bei der rheumatoiden Arthritis findet man Lymphozytenansammlungen u.a. in der Synovialmembran, die dann zu Arthritiden führen können.

Aufgrund des geringen Wissens über Pathogenese und mögliche Autoantikörper dieser Autoimmunerkrankungen, sollte das Ziel dieser Arbeit sein, ein mögliches Reaktionsmuster von Oberflächenreaktivitäten oder ein spezifisches Oberflächenprotein/Antigen zu lokalisieren.

Bei bestehenden komplexen experimentellem Ansatz gelang der Nachweis mittels Biotinylierung, dass die Membranpräparation als ein geeignetes Verfahren zur Gewinnung von Oberflächenmembranproteinen zu betrachten ist.

Neben diesem Ergebnis waren insgesamt verstärkte Oberflächenreaktivitäten bei den untersuchten Autoimmunerkrankungen, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, auffällig. Ob es sich hierbei um eine Umverteilung von intrazellulären Proteinen bei Gesunden zu Oberflächenreaktivitäten im Rahmen eines allgemeinen Entzündungsgeschehens handelt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Der experimentelle Ansatz war erfolgreich, denn es ergaben sich Hinweise auf ein unterschiedliches Reaktionsmuster bei Polymyositis, rheumatoider Arthritis und Lupus erythematodes. Die einzelnen Erkrankungen wiesen Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede in der Ausbildung ihrer Reaktivitäten auf.

So besitzen die untersuchten Autoimmunerkrankungen ihre Hauptaktivitäten in den Bereichen zwischen 50-100KDa und einem pH zwischen 5,0-8,0, sowie den Bereichen mit geringerem Molekulargewicht zwischen 30-50KDa, in denen sich zwischen 67-88% der Reaktivitäten befinden.

Im Gegensatz dazu ergaben sich bei den Normal Spendern in diesen Bereichen nur Aktivitäten von 53%. Ihre Hauptreaktivitäten befinden sich vorwiegend im pH-Bereich von 8,0-10,0, bei mittlerem bis höherem Molekulargewicht bei 80-120KDa. Unterschiede ergeben sich bei der Polymyositis im Vergleich mit den anderen Autoimmunerkrankungen in den Bereichen D und G-I mit Reaktivitäten von 32%. Bei der rheumatoiden Arthritis, der juvenilen-und reaktiven Arthritis befinden sich in diesen Abschnitten nur zwischen 15-17% der Reaktivitäten. Der Lupus erythematodes liegt bei Nachweis von 22% der Reaktivitäten in den Abschnitten D, sowie G-I, zwischen der Polymyositis und den Arthritiden.

Ganz anders verhalten sich die gesunden Kontrollspender mit Nachweis von 49% der Reaktivitäten in diesen Bereichen, wobei allein 25% der Reaktivitäten auf den Bereich zwischen 10-50KDa bei sauren bis leicht basischen pH entfallen. In diesem Abschnitt liegen nur zwischen 7-8% der Reaktivitäten bei der PM und beim SLE, während die Arthritiden Werte zwischen 0-2% aufweisen.

Der experimentelle Ansatz der Untersuchungen, erbrachte Erkenntnisse über Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Reaktionsmustern bei den einzelnen Gruppen und führte zum Nachweis von einzelnen spezifischen Oberflächenproteinen bei Polymyositis.

Hervorzuheben sind zwei Proteine von 45 KDa und 105 KDa bei einem pH von 8,0 bzw. 5,5 bei der Polymyositis, die bei ca. 32% der Erkrankten nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren gelang der Nachweis von spezifischen Proteinen in Höhe von 50%, mit einem Molekulargewicht u.a. von 45KDa und 50KDa bei rheumatoider Arthritis und 55KDa und 70KDa beim Lupus erythematodes. Dies ebnet den Weg für weiterführende Studien den Nachweis zu erbringen, ob es sich hierbei um Antigene oder um unspezifische Reaktivitäten im Rahmen einer unspezifischen Entzündungsreaktion handelt. Mit den darstellbaren spezifischen Oberflächenreaktivitäten ergeben sich möglicherweise in Zukunft neue Biomarker, zum Nachweis dieser Autoimmunerkrankung.

Hinweise für eine mögliche virale Genese und eine Beteiligung am Immunmechanismus ergeben sich aus dem Nachweis von Chaperoninen in der Aminosäuresequenzierung dieser spezifischen Proteine bei Polymyositis. Unterstützt wird dieser Verdacht zusätzlich durch Nachweis von NSE, hnRNP und SYNCRIP in der erfolgten Aminosäuresequenzierung der stärksten Reaktivitäten bei der Polymyositis. Die Beurteilung ihrer Bedeutung in der Pathogenese der

Polymyositis als mögliche Antigene selbst oder als Transportproteine für antigene Strukturen, auch viraler Bestandteile, vom Intrazellularraum an die Zelloberfläche bleibt offen.

Abschließend sei darauf hingewiesen, dass sich durch die Interpretation der Ergebnisse ein weites Feld für Zusatz- und weiterführende Untersuchungen ergibt. So besteht nicht nur Klärungsbedarf in der Frage ihrer Relevanz in der Pathogenese der untersuchten Autoimmunerkrankungen, sondern auch, ob es sich nur um eine Umverteilung von intrazellulären Proteinen zu Oberflächenreaktivitäten im Sinne einer unspezifischen Entzündungsreaktion handelt und ihre mögliche Verfügbarkeit als Biomarker.

7. Literaturverzeichnis

1. Stuhlmüller B., Jerez R., Hausdorf G., Barthel H.R., Meurer M., Genth E., Kalden J.R., Burmester G.R.: Novel autoantibodies directed against muscle-cell membrane proteins in patients with myositis. *Arthritis Rheum.* 39: 1860-1868 (1996)
2. Staines N., Brostoff J, James K. *Immunologisches Grundwissen.* Gustav Fischer Verlag, 3. Auflage, 1997, 9-10, 49-61, 78-80.
3. Löffler Georg, Petrides Petro. *Biochemie und Pathobiochemie. Immunsystem.* Springer Verlag. 6 Auflage. 1998. Pages 1058-1080
4. Gerok W., Huber Chr., Meinertz T., Zeidler H. *Die Innere Medizin,* Schattauer-Verlag, 10 Auflage 2000; Seiten 84-87, 93-96, 895-896, 906-912
5. Lehnert H. *Die Innere Medizin,* Thieme-Verlag, 3. Auflage 2001, Kapitel 16, Seiten 895-903
6. Dalakas M.C. *Molekular Immunology and Genetics of Inflammatory muscle diseases.* *Arch Neurology,* Vol. 55, Dec.98, 1509-1512
7. Dalakas M.C. *The molekular and cellular pathology of inflammatory muscle diseases.* *Current Opinion in Pharmacology,* Volume 1, Issue 3, 1.June 01, Pages 300-306
8. Lundberg I.E. *Editorial commentary: New possibilities to achieve increased understanding of disease mechanism in idipathic inflammatory myopathies.* *Current Opinion in Rheumatology* 2002, 14(6), 639-642
9. Meuten van der, M.F.G., Wichen van D.F., Blokland van W.T.M., Berg, van den L.H. et all. *Evidence for heterogenity of T-cell expansion in Polymyositis and Inclusion body myositis.* *Journal of Neuroimmunology,* Volume 133, Issue 1-2, December 02, Pages 198-204

10. Page G., Sattler A., Kersten S., Thiele A. Plasma Cell-Like Morphology of Th-1-Cytokine-Producing cells associated with the loss of CD3 Expression. *American Journal of Pathology*, 2004, 164, Pages 409-417
11. Page G., Chevrel G., Miossec P. Anatomic Localization of Immature and Mature Dendritic Cell Subsets in Dermatomyositis and Polymyositis. *Arthritis and Rheumatism*, Volume 50, No.1, January 04, Pages 199-208
12. Konttinen Y.T., Mackiewicz Z., Provilenaite D., Sukura A. et al. Disease-associated increased HIF-1, $\alpha\beta 3$ integrin and Flt-1 do not suffice to compensate the damage-inducing loss of blood vessels in inflammatory myopathies. *Rheumatology International* 03, 10.1007/s00296-003-0379-z.
13. Saito M., Higuchi I., Saito A., Shuji I. Et al. Molecular Analysis of T-cell Clonotypes in Muscle-Infiltrating Lymphocytes from Patients with Human T-Lymphotropic Virus-Type 1 Polymyositis. *The Journal of Infectious Diseases* 2002, 186, Pages 1231-1241
14. Benveniste O., Dubourg O., Henson S. New classifications and pathophysiology of the inflammatory myopathies. *Rev. Med. Interne*; 2007, September; 28(9); 603-12
15. Bernasconi P., Cappelletti C., Navone F. et al. The kinesin superfamily motor protein KIF 4 is associated with immune cell activation in idiopathic inflammatory myopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 2008, June; 67(6); 624-32
16. Greenberg SA., Proposed immunologic models of the inflammatory myopathies and potential therapeutic implications. *Neurology*; 2007, November 20; 69(21)
17. Baird G.S., Montine TJ. Multiplex immunoassay analysis of cytokines in idiopathic inflammatory myopathy. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2008, Feb.; 132(2); 232-38.

18. Krystufkova O., Vallerskog T., Barbasso Helmers S. et al. Increased serum levels of B-cell activating factor (BAFF) in subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Ann Rheum. Dis.*; 2008, July 5.
19. Bohan P., Peter JB. Polymyositis and Dermatomyositis (first of two parts). *New England Journal of Medicine*. 1975, 292, 344-347
20. Wakata N., Kurihara T., Saito E., Kinoshita M. Polymyositis and Dermatomyositis associated with malignancy, a 30-year retrospective study. *International Journal of Dermatology*, Volume 41, Issue 11, Page 729, November 2002
21. Miller F.W., Rider L.G., Plotz P.H., Isenberg D.A., Oddis C.V. Diagnostic Criteria for polymyositis and dermatomyositis. *The Lancet*, Volume 362, November 03, Correspondence
22. Krathen M., Fiorentino D., Werth V. et al. Dermatomyositis. *Curr. Div autoimmun*, 2008, 10; 313-32
23. Briani C., Doria A., Sarzi-Puttini P., Dalakas M.C. Update on idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity*, 2006, May; 39(3); 161-70
24. Choy E.H.S., Isenberg D.A. Treatment of dermatomyositis and polymyositis. *Rheumatology*, 2002, 41, 7-13. 14
25. Tawil R., Griggs R.C. Inclusion body myositis. *Current opinion in Rheumatology*, 2002, 14 (6), Pages 653-657
26. Stertz G. Polymyositis. *Berl Klin Wochenschr* 1916, 53, 489
27. Ito T., Kumamoto T., Horinouchi H., Yukishige K. Et al. Adhesion Molekule Expression in experimental Myositis. *Muscle and Nerve*, 25, 409-418, 2002.
28. Sigurgeirsson B., Lindelof B., Edhag O., Allander E. Risk of cancer in patients with dermatomyositis or polymyositis. A population-basd study. *New England Journal of Medicine*. 1992, 326, 363-367.

29. Hochberg MC, Feldmann D., Stevens MB. Adult onset polymyositis/ dermatomyositis. An analysis of clinical and laboratory features and survival in 76 patients with a review of the literature. *Semin Arthritis Rheum.* 1986,15, 168-178
30. Legault D., McDermott J., Crous-Tranaclis AM., Poire P. Cancer-associated myositis in the presence of anti-Jo1-autoantibodies and the antisynthetase syndrom. *J. Rheumatol.*; 2008, Jan.; 35(1); 169-71
31. Michels H., Burmester G.-R., Buttgereit F. i.v.-Immunglobuline bei chronischen idiopathischen Myositiden. *Zeitschrift für Rheumatologie*; 2005, March; 64(2); 102-110
32. Hilton Jones D. Inflammatory muscle diseases. *Current Opinion in Neurology* 01, 14, 591-596
33. Munshi SK:, Thanvi B., Jonnalagadda SJ. Et all. Inclusion body myositis: an underdiagnosed myopathy of older people. *Age Ageing*, 2006, Jan.; 35(1); 91-4
34. Chahin N., Engel AG. Correlation of muscle biopsy, clinical course and outcome in polymyositis and sporadic inclusion body myositis. *Neurology*; 2008, Feb. 5; 70(6); 414-15
35. Figarella-Branger D., Civatte M., Bartoli C., Pellissier J.-F. Cytokines, Chemokines and cell Adhesion Molekules in Inflammatory Myopathies. *Muscle and Nerve*, 28, Pages 659-682, 2003
36. Jain A., Sharma MC., Sarkar C. et all. Major histocompatibility complex class I and II detection as a diagnostic tool in idiopathic inflammatory myopathies. *Arch. Pathol. Lab. Med.*; 2007, July; 131(7); 1070-76
37. Guerne PA. Myositis; current data on the classification, diagnosis and treatment. *Rev. Med. Suisse*, 2008, March 19; 4(149); 718; 720-22
38. Brouwer R., Hengstman G.J.D., Vree Egberts W., Ehrfeld H. et all. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis* 01, 60, 116-123

39. Hengstmann G.J.D., Brouwer R., Vree Egberts W.T.M., Seelig H.P. et al. Clinical and serological characteristics of 125 Dutch myositis Patients. *Journal of Neurology*, 2002, 249, 69-75
40. Mimori T., Imura Y., Nakashima R. et al. Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathy: an update on clinical and pathophysiological significance. *Curr. Opin. Rheumatol.*; 2007 November; 19(6); 523-29
41. Gomard-Menesson E., Fabien N., Cordier J.F. et al. Clinical significance of anti-histidyl-t RNA-synthetase (Jo1)-autoantibodies. *Ann NY Acad. Sci.* ; 2007, August; 1109; 414-20.
42. Zack Howard D.M., Fang Dong H., Yang D., Raben N., Nagaraju K. et al. Histidyl-t-RNA-Synthetase and Asparaginyl-tRNA-Synthetase, Autoantigens in Myositis; Activate Chemokine Receptors on T-Lymphocytes and Immature Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, Volume 196, Number 6, September 02, Pages 781-791
43. Eloranta ML., Barbasso Helmers S., Hefgre AK. A possible mechanism for endogenous activation of the type I interferon system in myositis with anti-Jo 1 or anti-Ro 52/ anti-Ro 60 autoantibodies. *Arthritis Rheum.*; 2007, September; 56(9); 3112-24
44. Cavazzana I., Ceribelli A., Quinzanini M., Prevalence and clinical association of anti-Ku-antibodies in systemic autoimmune diseases. *Lupus*, 2008, August, 17 (8); 727-32
45. Suber TL. Casciola-Rosen L., Rosen A. Mechanism of diseases: autoantigenes as clues to the pathogenesis of myositis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*; 2008, April; 4(4); 201-09
46. Casciola-Rosen L., Nagaraju K., Plotz P. et al. Enhanced autoantigenes expression in regenerating muscle cells in idiopathic inflammatory myopathy. *J. Exp. Med.* ; 2005, Feb.21; 201(4); 591-601

47. Ascherman D.P., Oriss T.B., Odis C.V., Wright T. Critical Requirement for Professional APCs in Eliciting T-Cell Responses to Novel Fragments of Histidyl-t-RNA-Synthetase(Jo-1) in Jo-1 Antibody-positive Polymyositis. *The journal of Immunology* 02, 169, 7127-34
48. Rozman B., Cucnik S., Souin-Semrl S.et all. Prevalence and clinical associations of anti-Ku-antibodies in patients with systemic sclerosis; a European EUSTAP initiated multi-centre-case-control study. *Ann. Rheum.;* 2008, September 1.; 67(9) 1282-86
49. Wu X., Brooks R., Komives EA. Autoantibodies in canine masticatory muscle myositis recognize a novel myosin binding protein-C-family member. *J. Immunol. ,* 2007, Oktober 1; 179(7); 4939-44
50. Franceschini F., Cavazzana D., Generali D. et all. Anti-Ku-antibodies in connective tissue diseases: clinical and serological evaluation of 14 patients. *J. Rheumatol.;* 2002, July; 29(7); 1393-7
51. Kamei N., Yamane K., Yamashita Y. et all. Anti-Ku-antibody-positive scleroderma-dermatomyositis overlap-syndrome developing Graves´ disease and immune thrombocytopenic purpura. *Intern Med.;* 2002, December; 41(12); 1199-203.
52. Hirakata M. Investigation study of autoimmune disease. Study of clinical significance of autoantibody recognizing 140 KDa protein (CADM-140-antigen) in serum of clinically amyopathic dermatomyositis patient. *Jiko Meneki Shikkan,* 2005; 70-74
53. Gunawardena H., Wedderburn LR., North J. et all. Clinical associations of autoantibodies to a p155/140 KDa doublet protein in juvenile dermatomyositis. *Rheumatology(Oxford);* 2008, March; 47(3); 324-28
54. Kubo M., Ihn H., Kuwana M., , Yamane K., Yazana N., Tamaki K. Prevalence in Myositis of antibodies recognizing anti-43 RNA probably in a novel complex with 22/25 kD Protein and not fibrillarin. *Clinical and Experimental Immunology,* Volume 126, Issue 2, Page 339, November 01

55. Hirakata M. Autoantibodies and their clinical significance in idiopathic myopathies; polymyositis/dermatomyositis and related conditions. *Nihon kinsho Meneki Gakkai Kaishi*; 2007, December; 30(6); 444-54
56. Zhao J., Zhao Y., He J. et al. Prevalence and significance of anti-peptidylarginine deiminase 4-antibodies in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 2008, June; 35(6); 969-74
57. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Myositiden; www.deutsche-gesellschaft-fuer-neurologie.de
58. Pongratz D. Therapeutic options in autoimmune inflammatory myopathies (dermatomyositis, polymyositis, inclusion body myositis). *J. Neurol.* 2006, September, 253 Suppl. 5: V64-5
59. Wiendl, H.; Idiopathic Inflammatory Myopathies: Current and Future Therapeutic Options; *The American Society for Experimental n NeuroTherapeutics*; Vol.5,548-557, October 2008
60. Jorizzo LJ. 3-rd., Jorizzo J.L. The treatment and prognosis of dermatomyositis: an updated review, *J. Am. Acad Dermatol.*; 2008, July; 59(1); 99-112
61. Richter J., Iking-Konert C. Current treatments of dermatomyositis and polymyositis. *J. Rheumatol.*; 2007, December; 66(8); 686-92
62. Friedrich-Baur-Institut-Klinikum der Universität-München; Myositiden, www.friedrich-baur-institut.de
63. Hengstman G.J., De Bleecker JC., Feist E. et al. Open-label trial of anti-TNF-alpha in dermato-and polymyositis treated concomitantly with methotrexate. *Eur. Neurol.*; 2008; 59 (3-4); 159-63
64. Mastaglia FI. When the treatment does not work: polymyositis. *Pract. Neurol.*; 2008, June; 8(3); 170-74
65. Gallen J.P. Immunomodulatory treatment for dermatomyositis. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2008, July; 8 (4); 348-53

66. De Bleecker J.L., Creus K.K., De Paepe B. Potential therapeutic targets for idiopathic inflammatory myopathies. *Drugs News Perspect*; 2006, November; 19(9); 549-57
67. Choy E.H., Hoogendijk J.E., Lecky B. Immunosuppressant and immunomodulatory treatment for dermatomyositis and polymyositis. *Cochrane Database System Rev.*, 2005, July 20;(3); CD: 003643
68. Saito E., Koiko T., Hashimoto H. et al. Efficacy of high-dose intravenous immunoglobulin therapy in Japanese patients with steroid-resistant polymyositis and dermatomyositis. *Mod.rheumatol.*; 2008; 18(1); 34-44
69. Alexanderson H., Lundberg E., Stenström H. Development of the Myositis Activities Profile and Validity and Reliability of a Self-Administered Questionnaire to assess Activity Limitations in Patients with Polymyositis/ Dermatomyositis. *The journal of Rheumatology* 02, 29, 2386-92
70. Kernich Ca. Patient education pages. Polymyositis. *Neurologist*, 2008, May, 14 (3); 205-06
71. Reichlin M., Fesmire I., Quintero-Del-Rio A.I., Wolfson-Reichlin M. Autoantibodies to lipoprotein lipase and dyslipidemia in systemic lupus erythematoses. *Arthritis and Rheumatism*, Volume 46, Issue 11, 2002, Pages 2957-2963
72. Braun Jörg, Dormann Arno, *Klinikleitfaden Innere Medizin*, Urban und Fischer Verlag. 9. Auflage 2003, Rheumatoide Arthritis. Pages 474-478
73. Westerblad H., Allen D.G. Recent advances in the understanding of skeletal muscle fatigue. *Current Opinion in Rheumatology*, 2002, 14 (6), Pages 648-652
74. Klink Rainer, Silbernagl Stefan, *Lehrbuch der Physiologie, Muskulatur*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2.Auflage 1996, Pages 80-100
75. Hahn G., Stuhlmüller B., Hain N., Kalden J.R., Pfizenmaier K., Burmester G.R.. Modulation of monocyte activation with rheumatoid arthritis by leukapheresis therapy. *J. Clin Invest.* 91; 862-870 (1993)

76. Stuhlmüller B., Ungethum U., Scholze S., Martinez L., Backhaus M., Kraetsch H.G., Kinne, R.W., Burmester G.R.: Identification of known and novel genes in activated monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43: 775-90 (2000)
77. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie e.V. TNF-alpha-Blocker. www.ggrh.de
78. Gates GA, Holland PC, Surface-labelling studies on skeletal-muscle cells in vitro. Heterogeneity of iodinated cell-surface proteins. *Biochem. J.* 186; 211-216; 1980
79. Chevrel G., Calvet A., Belin V. et al : Dermatomyositis associated with the presence of Parvovirus B19 DNA in muscle. *Rheumatology*; 2000; 39; 1037-39
80. Harris C., Boden R., Astell C.: A Novel Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein-like Protein Interacts with NS1 of the Minute Virus of Mice. *Journal of Virology*; 1999, January; p 72-80
81. Azzi A., Manaresi E., Zakrzewska K. et al: Antibody response to B19 Parvovirus VP1 and VP2 linear Epitopes in Patients with Haemophilic Arthritis. *Journal of Medical Virology*; 72; 679-682; (2004)
82. Avirutnan P., Zhang L., Punyadee N. et al: Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. *PLoS Pathogens*; November 2007; Volume 3, Issue 11; 1798-1812
83. Heegaard N.H.H., Larsen M.R., Muncreif T. et al: Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 identified as autoantigens by biochemical and mass spectrometric methods. *Arthritis Research*; Volume 2, Number 5; 7/2000; 407-414

84. Hahm B., Kim Y.K., Heon J. et al: Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein L Interacts with the 3' Border of the Internal Ribosomal Entry Site of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*; November 1998; Volume 72, Number 11, 8782-8788
85. Mizutani A., Fukuda M., Iwata K. Et al: SYNCRIP, a Cytoplasmic Counterpart of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein R, Interacts with Ubiquitous Synaptotagmin Isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.275, No. 13, Issue 31, 2000, pages 9823-9831
86. Banna H., Fukatsu K., Mizutani A. et al: An RNA-interacting Protein, SYNCRIP I Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Q1 (NSAP1) is a component of mRNA Granule Transported with Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor type 1 mRNA in Neuronal Dendrites. *The Journal of Biological Chemistry*, Volume 279, No.51, Dec.17. 2004, pages 53427-34
87. Liu H.M., Aizaki H., Choi K.S. et al: SYNCRIP (synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA-interacting protein) is a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology*; 386; 2009; 249-256
88. Majumder M., Yaman D., Gaccioli F. et al :The hnRNA-Binding Proteins hnRNPL and PTB Are Required Efficient Translation of the Cat-1 Arginine transporter mRNA during Amino Starvation. *Molecular and Cellular Biology*, May 2009, Pages 2899-2912
89. Guinea-Viniger J., Zenk P., Schenck H. et al: TNF alpha shedding and epidermal inflammation are controlled by Jun proteins. *Genes Dev.*, 2009,23, Pages 2663-2674
90. Endres K., Postina R., Schroeder A. et al : Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *The FEBS Journal*, 272(2005), 5808-5820
91. Jordan P., Heid H., Künzel V. et al: Major cell-surface-located protein substrates of an ecto-protein kinase are homologs of known nuclear proteins. *Biochemistry*; 1994; 33 (49); 14696-14706

92. McCallum C.D., Do H., Johnson A.E. et al: The Interaction of the Chaperonin Tailless Complex Polypeptide 1(TCP1) ring Complex (TriC) with Ribosome-bound Nascent Chains Examined using Photo-cross-linking. *The Journal of Cell Biology*; May, 1. 2000; Volume 149, Number 3; 591-601
93. Stirling P.C., Srayko M., takhar K.S. et al: Functional Interaction between Phosducin-like Proteins and Cytosolic Chaperonin is Essential for Cytoskeletal Protein Function and Cell Cycle Progression. *Molekular Biology of the Cell*; Vol. 18, 2336-2345; June 2007
94. Koren E., Wolfson Reichlin M., Koscec M. et al: Autoantibodies to the Ribosomal P Proteins React with a Plasma Membrane-related Target on Human cells. *Journal of Clinical Investigation*; April 92; Volume 89; 1236-1241
95. Agmon-Levin N., gilburd B., Kivity S. et al: Anti-Ribosomal-P Antibodies in Lupus Patients and healthy Controls: Evaluation of Three ELISA-Assays. *JMAY*; Volume 11, July 2009, 403-406
96. Zampieri S., Mahler M, Blüthner M. et al: Recombinant anti-P protein autoantibodies isolated from a human autoimmune library: reactivity, specificity and epitope recognition. *CMLS;cell.Mol.Life.Sci.* 60; (2003); 588-598

8. Tabellen-und Abbildungsverzeichnis

	Seite
Tabellen	
Tabelle 1	17
Darstellung des prozentualen Vorkommens von Myositis spezifischen Autoantikörpern	
Tabelle 2	18
Darstellung der prozentualen Häufigkeit von Myositis assoziierten Antikörpern bei Autoimmunerkrankungen	
Tabelle 3	19
Darstellung des prozentualen Vorkommens von Autoantikörpern bei Autoimmunerkrankungen mit Hilfe von Protein-Mikroarrays	
Tabelle 4	48
Koordinative Darstellung der Teilflächen	
Abbildungen	
Abbildung 1	40
Biotin-Nachweis mit Streptavidin-AP auf der 2D-Nylonblotmembran	
Abbildung 2	41
Silbernitratfärbung der biotinylierten Plasmamembranproteine nach der 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	
Abbildung 3	42
Darstellung der reaktiven Oberflächenproteine bei Polymyositis nach erfolgtem Western-Blot und nach vorausgehender Auftrennung in der 2D-Elektrophorese nach pH-Wert auf der Abszisse und Molekulargewicht (MG) in Kilodalton auf der Ordinate	
Abbildung 4	42
Darstellung der reaktiven Oberflächenproteine bei gesunden Kontrollen	
Abbildung 5	44
Darstellung aller reaktiver Oberflächenproteine der untersuchten Kontrollgruppe, bestehend aus an RA-und SLE-Erkrankten, Gesunden, sowie an reaktiver Arthritis und an juveniler Arthritis Erkrankter	
Abbildung 6	44
Darstellung aller nachweisbaren reaktiven Oberflächenproteine mit Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis	

Abbildung 7	Darstellung der gesamten nachweisbaren reaktiven Oberflächenproteine der untersuchten Polymyositis-Erkrankten	45
Abbildung 8	Darstellung der Gesamtoberflächenreaktivitäten beim Lupus erythematoses	46
Abbildung 9	Gesamtdarstellung der Oberflächenproteine in der gesunden Kontrollgruppe	46
Abbildung 10	Darstellung der Gesamtreaktivitäten bei juveniler Arthritis	47
Abbildung 11	Darstellung der gesamten nachweisbaren Oberflächenproteine bei reaktiver Arthritis. Aufteilung des Blots mit seinen Reaktivitäten in die Teilflächen A-J mit Begrenzung der Flächen nach den Koordinaten Molekulargewicht auf der Ordinate und des pH-Wertes auf der Abszisse	48
Abbildung 12	Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilflächen bei Polymyositis	49
Abbildung 13	Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilflächen bei juveniler Arthritis	50
Abbildung 14	Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilflächen bei der rheumatoider Arthritis	51
Abbildung 15	Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilflächen bei reaktiver Arthritis	51
Abbildung 16	Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilflächen bei Lupus erythematoses	52
Abbildung 17	Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilflächen bei gesunden Probanden	53
Abbildung 18	Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche A bei den untersuchten Gruppen	54
Abbildung 19	Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche B bei den untersuchten Gruppen	54

Abbildung 20	Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche D bei den untersuchten Gruppen	55
Abbildung 21	Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche F bei den untersuchten Gruppen	56
Abbildung 22	Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche H bei den untersuchten Gruppen	56
Abbildung 23	Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche I bei den untersuchten Gruppen	57
Abbildung 24	Darstellung der Reaktivitätsanteile in Prozent innerhalb der Teilfläche J bei den untersuchten Gruppen	58
Abbildung 25	Darstellung der Teilflächen A1, B1, B2, C1, C2, H1, H2, J1 der für die weiteren Betrachtungen relevanten Detailbereiche bei der Polymyositis	59
Abbildung 26	Darstellung der vergrößerten relevanten Detailflächenbereiche A1, B1, B2, C1, C2, H1, H2, J1 aus Abbildung 12 bei Polymyositis	60
Abbildung 27	Darstellung der spezifischen Proteine als Säulendiagramm mit Molekulargewicht auf der Abszisse und pH-Wert auf der primären Ordinate. Die Häufigkeit des spezifischen Proteins wurde linear zu der sekundären Ordinate aufgetragen	61
Abbildung 28	Grafische Darstellung der für die weitere Betrachtung relevanten Teilflächen bei der gesunden Kontrollgruppe	62
Abbildung 29	Grafische Darstellung der für die weitere Betrachtung relevanten Teilflächen bei rheumatoider Arthritis	63
Abbildung 30	Darstellung der relevanten Teilflächen A1, B1, B2, C1, C2, H1, H2, J1 bei der Polymyositis	65

9. Abkürzungsverzeichnis

ANA	antinukleäre Antikörper
Anti-U1-RNP	ribonukleäre Proteine der Untereinheit U1
AP	Alkalische Phosphatase (1M TRIS, 3M Natriumchlorid, 100mM Magnesiumchlorid)
APPs alpha	amyloid precursor protein
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphatase
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
°C	Temperatureinheit Celsius
Cat-1	Cationic amino acid transporter
CCP	Cyclic Citrullineted Peptide
CENP-B	Centromer Protein B
CK	Kreatinkinase
DM	Dermatomyositis
DMS	Dimethylsuberimidate
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-essigsäure
EMG	Elektromyographie
FCS	fetal calf serum
g	relative Zentrifugationsbeschleunigung
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transferase
h	Stunden
HCL	Salzsäure
hnRNP	heterogenous nuclear ribonucleoprotein
IBM	Inclusion Body Myositis
IP	isoelektrischer Punkt
IRES	internal ribosomal entry site
ITAFs	Translation –initiation factors
KDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
M	molar
mA	Milliampere
MAA	Myositis assoziierte Antikörper
MAC	membranolytic attack complex
MCTD	mixed connective tissue disease

MG	Molekulargewicht
MHC I	Major histocompatibility complex I
MHC II	Major histocompatibility complex II
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimol
MSA	Myositis spezifische Antikörper
MTX	Methotrexat
µl	Mikroliter
NBT	Nitro-blue-Tetra-zolium
NH ₂	Amino-
NHS	N-hydroxysuccinimid-
NSAR	nicht steroidale Antirheumatika
NSE	non struktural protein
PAD 4	Peptidyl-arginin Deiminase 4
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PM	Polymyositis
PO	ribosomales Phospho-protein
PTB	polypyrimidine tract binding protein
RA	rheumatoide Arthritis
RPMI 1640	5,5g/l NaCl, 5 mg/l Phenol, 2g/l Natriumhydrogencarbonat, 25 mM HEPES, 0,532 g/l N-acetyl-L-alanyl-L-glutamine
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gel elektrophorese
sec	Sekunden
SLE	systemischer Lupus erythematoses
Sm-Antigene	Smith-Antigen
SYNCRIP	Synaptotagmin-binding cytoplasmatic-RNA-interacting Protein
TACE	TNF-alpha-converting enzyme
TIMP-3	tissue inhibitor of metalloproteinase-3
TNF-alpha	Tumornekrose Faktor alpha
TRIS-Puffer	tris-hydroxymethylaminomethan
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
ZNS	zentrales Nervensystem

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Burmester,
Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Rheumatologie und Klinische Immunologie,
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin,
danke ich für seine freundliche Unterstützung und die Bereitschaft,
diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Mein Dank gilt weiterhin meinem Betreuer,
Herrn Laborleiter Dr. rer. nat. Stuhlmüller,
für die interessante Aufgabenstellung, seine konstruktiven Hinweise,
technische Unterstützung und Hilfestellung.

Ausserdem danke ich meinem Chef,
Herrn Prof. Dr. med. Schuster,
Chefarzt der Kardiologischen Klinik des St.-Marienkrankenhauses Siegen,
für sein großes Interesse am Fortschreiten der Arbeit
und seine aktive Unterstützung.

11. Selbständigkeitserklärung

Ich, Verena Lehmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift zu dem Thema

**Humorale Immunreaktivitäten
gegen Muskelzell-Membranproteine
bei entzündlichen Myositiden**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Verena Lehmann

12. Lebenslauf

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

13. Publikationsliste

- a) Eingereicht bei der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie
am 19.04.2000

Identification and characterization of polymyositis
specific muscle plasma membrane proteins

Autoren: Gerd R. Burmester, Pranav Sinha,
Bruno Stuhmüller, Silke Erdmann,
Verena Lehmann

- b) Jahresbericht 2001-Myositis

Muskelerkrankungen-
Charakterisierung muskelzellspezifischer Membranproteine
bei Patienten mit inflammatorischer Myositis

Autoren: Prof. Dr. Gerd - R.- Burmester, Prof. Prahna Sinha,
Dr. Bruno Stuhmüller, Dr. Eugen Feist,
Dr. Thomas Häupl, Dr. S. Erdmann, Verena Lehmann