

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie  
An der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. Stephan Zierz)

Plasmazellen bei Polymyositis, Jo-1-Syndrom mit Myositis, Dermatomyositis  
und Einschlußkörpermyositis

Dissertation  
Zur Erlangung des akademischen Titels  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

Vorgelegt  
Der Medizinischen Fakultät  
Der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von Heinz Hartl  
Geboren am 03.12.1972 in München

Gutachter:

1. Prof. Dr. S. Zierz
2. Prof. Dr. R. Gold
3. Prof. Dr. H.-J. Holzhausen

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens  
Datum der Verteidigung

02.09.2008  
08.10.2009

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern sowie meinem verstorbenen  
Schwiegervater

## **Kurzreferat**

Einleitung: Polymyositis (PM), Jo-1-Syndrom mit Myositis (Jo-1-Syndrom), Dermatomyositis (DM) und Einschlußkörpermyositis (IBM) sind autoimmun-entzündliche Myopathien. Bei PM und IBM sind überwiegend zelluläre Immunmechanismen verantwortlich, bei DM eine humorale Immunantwort. Das Jo-1-Syndrom wurde bisher als Unterform zur PM oder DM gezählt. Bisher wurden nur naive B-Lymphozyten (BL) mittels CD20-Antikörpern gefärbt. Nach Aktivierung zu Plasmazellen (PZ) geht aber CD20 auf der Oberfläche der PZ verloren, dafür wird CD138 exprimiert. Kürzlich konnten bei einem Patienten mit PM und wenigen Fällen mit IBM eine erhöhte Zahl an PZ gefunden werden. Fragestellung: Ziel der Arbeit war eine qualitative und quantitative Analyse von BL und PZ zur Charakterisierung der humoralen Immunkomponente bei oben genannten entzündlichen Myopathien.

Methoden: Muskelbiopsien von 7 Patienten mit PM, 4 mit Jo-1-Syndrom, 6 mit DM und 6 mit IBM wurden mit einer Palette standardisierter immunhistochemischer Marker einschließlich CD20 und CD138 in determinierten Akkumulationszonen (perimysial, perivaskulär, endomysial) untersucht. Ergebnisse: Bei PM und IBM waren mehr BL und PZ zu finden als bei DM oder Jo-1-Syndrom, wobei perimysial und endomysial mehr PZ als B-Lymphozyten vorkamen. Bei der DM waren perivaskulär mehr BL als PZ zu finden, perimysial mehr PZ als BL. Beim Jo-1-Syndrom waren dagegen perivaskulär mehr PZ als BL zu finden. Schlussfolgerungen: Eine humorale Immunantwort spielt bei PM und IBM eine größere Rolle als bislang angenommen. Bei der bekannten, überwiegend humoralen Immunreaktion bei der DM konnte erstmals gezeigt werden, dass die Aktivierung der BL nicht schon perivaskulär, sondern erst perimysial erfolgt. Demgegenüber waren beim Jo-1-Syndrom die aktivierten BL bereits perivaskulär nachweisbar. Dies scheint für eine Aktivierung außerhalb des Muskels und auch dafür zu sprechen, dass es sich beim Jo-1-Syndrom um eine eigenständige Krankheit handelt.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1.	Einleitung	1
1.1.	Klassifikation der Myositiserkrankungen	2
1.2.	Diagnostische Kriterien	3
1.2.1.	Klinische Merkmale	5
1.2.2.	Elektromyographische Befunde	7
1.2.3.	Laborchemische Merkmale	8
1.2.4.	Histologische Kennzeichen	8
1.3.	Immunpathologischer Hintergrund	16
2.	Fragestellung	20
3.	Patienten	20
4.	Material und Methoden	24
4.1.	Material	24
4.1.1.	Reagenzien	24
4.1.2.	Antikörper	24
4.1.3.	Fluoreszenzfarbstoffe	25
4.1.4.	Herstellung der benutzten Lösungen	25
4.1.5.	Geräte	26
4.1.6.	Software	26
4.2.	Methoden	26
4.2.1.	Muskelbiopsien	
4.2.2.	Färbungen	26
4.2.3.	Methode der Auszählung der B-Lymphozyten und Plasmazellen	36
4.2.4.	Statistik	39

5.	Ergebnisse	41
5.1.	Histologie	41
5.2.	B-Lymphozyten und Plasmazellen	43
6.	Diskussion	52
6.1.	B-Lymphozyten und Plasmazellen bei PM, DM, IBM	52
6.2.	Pathogenetische Überlegungen	55
6.2.1.	Rolle der B-Lymphozyten und Plasmazellen bei der Entstehung der idiopathischen inflammatorischen Myopathien	55
6.2.2.	Polymyositis, Dermatomyositis, Einschluss- körpermyositis	57
6.2.3.	Jo-1-Syndrom mit Myositis	61
7.	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	64
8.	Literaturverzeichnis	67
9.	Thesen	74
10.	Lebenslauf	
11.	Danksagung	

## Abkürzungsverzeichnis

AMPD	Adenosin-5'-Monophosphat-Deaminase
ANA	Antinukleäre Antikörper
ASAT	Aspartat-Amino-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	B cell activating factor of the TNF family
BCA	B Cell Common Antigen
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutkörper senkungsgeschwindigkeit
BZ	B-Lymphozyten
CD	Cluster of Differentiation
CK	Creatinkinase
COX	Cytochrom-C-Oxidase
CT	Computertomographie
Cy3	Fluorescent Cyanine Dye
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DM	Dermatomyositis
DNS, DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EMG	Elektromyogramm
FITC	Fluorescein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Wasserstoffchlorid
HE	Haematoxylin-Eosin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
IBM	Einschlußkörpermyositis (Inclusion Body Myositis)
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IgG	Immunglobulin G
IIM	Idiopathische inflammatorische Muskelerkrankung
Jo-1	Histidyl-tRNA-Synthetase
KCl	Kaliumchlorid

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
LCA	Leucocyte Common Antigen
MAC	Membrane Attack Complex
ME	Myositiserkrankungen
MHC	Major Histocompatibility Complex
MW	Mittelwert
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NaOH	Natriumhydroxid
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PAS	Periodic Acid Schiff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PM	Polymyositis
PZ	Plasmazellen
SDH	Succinatdehydrogenase
Sm	Smooth Muscle
SRP	Signal Recognition Particle
TCA	T Cell Common Antigen
TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan
VCAM	Vascular Adhesion Molecule

## 1. Einleitung

Idiopathische inflammatorische Muskelerkrankungen (IIM) stellen eine heterogene Gruppe von Krankheitsbildern dar (11). Diese sind charakterisiert durch inflammatorische Zellinfiltrate im Muskelgewebe sowie Muskelschwäche (34). Die größte Gruppe an erworbenen und therapierbaren Myositiserkrankungen (ME) stellen die Polymyositis (PM), die Dermatomyositis (DM) und die Einschlußkörpermyositis (Inclusion Body Myositis, IBM) (67).

PM und DM gelten als Autoimmunerkrankungen. Während die Entzündung bei PM und IBM auf die Skelettmuskulatur beschränkt ist, liegt bei der DM zusätzlich eine Beteiligung der Haut und Hautanhangsgebilde vor (83). Bei der Entstehung der IBM spielen zusätzlich Alterungsprozesse, genetische Faktoren und Umwelteinflüsse eine Rolle. Es wird noch diskutiert, ob es sich bei der IBM um eine autoimmune Entzündung oder primär myodegenerative Erkrankung mit sekundären entzündlichen Veränderungen handelt (63).

PM, DM und IBM unterscheiden sich durch Klinik, elektromyographische, laborchemische und histologische Gesichtspunkte und teils verursachende Immunmechanismen (18, 17). Siehe dazu Punkt 1.2 und 1.3.

Die Polymyositis kommt am häufigsten bei Erwachsenen (nach der 2. Lebensdekade) vor (16). PM bei Kindern ist eine Rarität, es gibt jedoch einzelne Fallberichte (27). Die Polymyositis kann histologisch nochmals unterteilt werden in T-Zell-vermittelte PM, eosinophile oder granulomatöse PM (57).

Weiter gibt es Myositiden, die mit spezifischen Autoantikörpern assoziiert sind, wie das so genannte Jo-1-Syndrom mit Myositis. Diese Erkrankung wird zu den Anti-Synthetase-Syndromen gezählt. Bei ca. 30-40% werden Anti-Synthetase-Antikörper gefunden (75). Die Assoziation von Myositis, interstitieller Lungenerkrankung, Polyarthritits und Raynaud-Phänomen wird Jo-1-Antikörper-Syndrom genannt. Diese Symptome können in unterschiedlicher Ausprägung vorliegen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden immer Patienten mit Jo-1-Syndrom mit Myositis untersucht. Antikörper sind gegen die Histidyl-tRNA-Synthetase gerichtet, ein Enzym,

das die Bindung von Histidin an seine spezifische tRNA katalysiert. Jo-1-Antikörper können im Serum von ca. 20% bis 30% der Patienten mit Myositiden gefunden werden (83).

Die DM kann man in eine juvenile und adulte Form unterteilen (7, 15). Die meisten Fälle in der Kindheit treten zwischen dem 5. und 14. Lebensjahr auf. Typisches Erkrankungsalter bei Erwachsenen ist die 5. und 6. Lebensdekade (27). Bei der DM sind Frauen häufiger als Männer betroffen (16).

Die IBM tritt erst nach dem 50. Lebensjahr auf. Epidemiologisch ist sie die in dieser Altersgruppe am häufigsten vorkommende Muskelerkrankung. Die IBM kommt dreimal häufiger bei Männern als bei Frauen vor (16). Bei der IBM kann nur die sporadisch auftretende Form zu den IIM gezählt werden, da nur bei dieser Erkrankung teils ausgeprägte entzündliche Veränderungen im Muskelbiopsat zu finden sind. Es gibt auch eine hereditäre Form mit autosomal rezessivem oder autosomal dominantem Erbgang, die mit der sporadischen Form nur das Auftreten von so genannten „Rimmed Vacuoles“ und elektronenmikroskopisch nachweisbaren filamentösen Einschlüssen in den Muskelfasern gemeinsam hat. Dafür findet man selten inflammatorische Infiltrate oder eine Hochregulation der MHC-I-Expression der Muskelfasern (63).

Daneben gibt es noch weitere spezifische inflammatorische Myopathien, siehe dazu Tab. 01.

### **1.1. Klassifikation der Myositiserkrankungen**

Im Jahr 1975 definierten Bohan A und Peter JB eine Klassifikation der entzündlichen Muskelerkrankungen (7). Diese erscheint aufgrund neuerer Untersuchungsmethoden (immunhistochemische Färbungen, genetische und biochemische Verfahren) und damit immer besserer Unterteilungsmöglichkeiten der IIM jedoch überholt und verbesserungsbedürftig (57, 15). Eine einheitliche Klassifikation ist allerdings noch nicht erreicht (84).

In einer Klassifikation von 2002 werden myositisspezifische Antikörper, wie die Jo-1-Antikörper nicht erwähnt. In zwei Arbeiten werden Myositiden mit

spezifischen Autoantikörpern, wie das Jo-1-Syndrom noch nach klinischen Charakteristika zur PM oder DM gerechnet (83, 72). Eine eigenständige Klassifikation der Myositiden mit spezifischen Autoantikörpern wurde aufgrund genetischer, immunreaktiver und klinischer Unterschiede vorgeschlagen (52).

**Tab. 01: Vorgeschlagene Klassifikation der idiopathischen inflammatorischen Myopathien (nach Mastaglia FL und Phillips BA (57))**

---

I	Dermatomyositis
	Juvenile DM
	Adulte DM
II	Polymyositis
	T-Zell-vermittelte PM
	Eosinophile PM
	Granulomatöse PM
III	Overlap Syndrome
	Mit PM
	Mit DM
	Mit IBM
IV	Tumorassoziierte Myositis
V	Sporadische Inclusion Body Myositis
VI	Andere Formen
	Fokal: z.B. orbitale Myositis
	Diffus: z.B. nekrotisierende Myopathie

---

## 1.2. Diagnostische Kriterien

Obwohl die Diagnose einer ME aufgrund klinischer Aspekte vermutet werden kann und durch erhöhte Serum-Creatinkinase-Werte (HyperCKämie) sowie ein myopathisches Elektromyogramm (EMG) zusätzlich erhärtet wird, ist die definitive Diagnosestellung nur durch histopathologische Veränderungen möglich. Dazu wird eine Muskelbiopsie benötigt (67).

Eine HyperCKämie hat eine geringe Spezifität, kann bei anderen Myopathien ohne inflammatorische Veränderungen erhöht sein, kann aber auch bei einigen Patienten mit IIM, vor allem bei PM und IBM normal sein.

Andererseits kann eine Erhöhung der CK bis etwa zum 5-fachen des Ausgangswertes auch bei neurogenen Prozessen vorkommen. Andere Serumenzyme, wie Aldolase, Blutkörperchengeschwindigkeit (BSG) oder Transaminasen können ebenfalls erhöht sein, sind aber genauso unspezifisch. Ähnlich verhält es sich mit den myopathischen Veränderungen im EMG. Ein normales EMG schließt eine IIM nicht aus (57). In einigen Fällen ist auch die Diagnosestellung einer IIM mittels Muskelbiopsie und histologischer Aufarbeitung erschwert. Es gibt Fälle mit unterschiedlicher Verteilung der inflammatorischen Infiltrate. Bei Biopsie eines noch nicht mit Entzündungszellen durchsetzten Muskelgewebes oder bei nur unspezifischen histo-morphologischen Veränderungen und gleichzeitig unspezifischen klinischen Symptomen, Laborparametern und elektromyographischen Befunden könnte eine erneute Biopsie eines anderen Muskels nötig werden. Letztendlich ist nur in Zusammenschau aller Parameter und insbesondere des histologischen Befundes die Diagnosestellung einer IIM möglich.

**Tab. 02: Diagnostische Kriterien für Polymyositis, Dermatomyositis, Einschlusskörpermyositis (nach Pongratz D und Späth M (67))**

	Polymyositis		Dermatomyositis		Einschlusskörpermyositis
<b>Kriterium</b>	definitiv	möglich	definitiv	leichte oder beginnende Form	definitiv
<b>Muskelkraft</b>	Proximale Paresen	Proximale Paresen	Proximale Paresen	fast normale Kraft	Proximale und distale Paresen
<b>EMG</b>	myopathisch	myopathisch	myopathisch	myopathisch oder unspezifisch	myopathisch, mögliche "neurogene" Komponente
<b>Muskelenzyme</b>	erhöht (bis 50fach)	erhöht (bis 50fach)	erhöht (bis 50fach)	erhöht (bis 10fach) oder normal	erhöht (bis 10fach) oder normal
<b>Muskelbiopsie</b>	diagnostisch	unspezifisch oder ohne entzündliche Reaktion	diagnostisch	diagnostisch oder unspezifisch	diagnostisch

Ältere diagnostische Kriterien sind die von Bohan A und Peter JB (7) aus dem Jahr 1975, allerdings wurden diese Kriterien speziell für die Diagnose einer PM oder DM entwickelt. In einer Studie aus dem Jahr 1997 an einer großen

Gruppe von Patienten mit IIM wurde allerdings noch eine Sensitivität der Kriterien von Bohan A und Peter JB (7) für PM und DM von 74% bis 100% gefunden (76). Das Jo-1-Syndrom und die IBM waren nicht berücksichtigt worden.

### **1.2.1. Klinische Merkmale**

PM, Jo-1-Syndrom, DM und IBM entwickeln sich subakut über Wochen bis Monate, die IBM kann sich aber auch langsam über einen Zeitraum von 20 Jahren entwickeln (33).

Bei allen 4 Formen der IIM kommt es zur Entwicklung einer oft symmetrischen Muskelschwäche mit proximaler Betonung. Bei der IBM können aber auch distale Muskelgruppen beteiligt sein mit Betonung der Fingerflexoren (57). Ungefähr zwei Drittel der Patienten mit IIM klagen über Myalgien, wobei dieses Symptom bei der IBM deutlich seltener vorkommt. Die Reflexe sind abgeschwächt, solange aber noch funktionsfähiger Muskel vorhanden ist, kann man sie aber noch auslösen (84). Im späteren Krankheitsverlauf treten bei allen 4 Formen gehäuft Muskelatrophien und Kontrakturen auf. Bei der PM, häufiger aber bei der DM, kann es zu Muskelkalzinosen kommen. Diese sind jedoch asymptomatisch und werden eher zufällig bei Röntgenuntersuchungen festgestellt (46). Die DM ist auch charakterisiert durch dermatitische Hautveränderungen. Hierbei handelt es sich oft um ein lokalisiertes oder diffuses heliotropes Erythem im Gesicht, symmetrische erythematöse Plaques mit oder ohne Ödem periorbital, im Bereich des Nackens, am vorderen Halsausschnitt oder den Streckseiten der Extremitäten. Bei ca. 70% der Patienten mit DM treten erythematöse, schuppige Papeln und Plaques über dorsalen Interphalangeal-, Metacarpophalangeal-, Ellenbogen- und Kniegelenken auf. Diese werden als Gottron'sche Papeln bezeichnet. Im Bereich der Finger kann es zu Hyperkeratosen und teils schmerzhaften Rhagaden kommen, so genannten „Mechaniker-Händen“ (46). Teleangiektasien, petechiale Blutungen und Hautatrophien am Nagelfalz (so genanntes „Keinig-Zeichen“) können ebenfalls bei der DM auftreten (84).

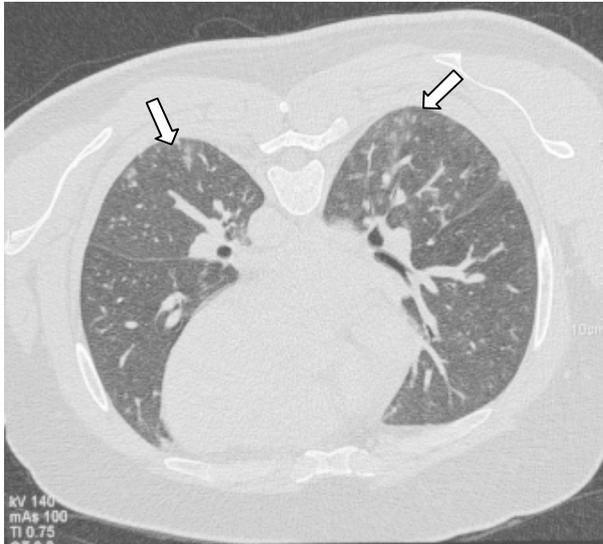
Eine im Krankheitsverlauf früh auftretende Parese der Quadrizepsmuskulatur mit entsprechender Neigung zu Stürzen gilt für die IBM als typisches klinisches Kennzeichen.

Eine systemische Mitbeteiligung und Befall anderer Organe außer des Skelettmuskels und der Haut findet man am häufigsten beim Jo-1-Syndrom und der DM, weniger häufig bei der PM. Die Patienten mit PM, Jo-1-Syndrom und DM, weniger mit IBM, berichten über Müdigkeit und Abgeschlagenheit. Teils kann es auch zu subfebrilen Temperaturen und Gewichtsverlust kommen.

Als Zeichen einer Beteiligung der Schlundmuskulatur und einer Hypomobilität des Oesophagus kann es bei allen 4 Formen der IIM zu einer Dysphagie kommen. Diese ist sogar bei ca. 60% der Patienten mit IBM nachweisbar (14). Bei Beteiligung der Atemmuskulatur kommt es zur Luftnot. Als Begleitsymptome oder Prodromi einer PM oder DM gelten auch Konjunktivitis, ödematöse Schwellungen der Extremitäten, Raynaud-Syndrom oder Synovitis mit schmerzhaften Gelenkschwellungen (84). Gelegentlich kann das Bild der IIM mit anderen aus dem Formenkreis der Kollagenosen vermischt sein (so genanntes „Overlap-Syndrom“). Am häufigsten kommen „Overlap-Syndrome“ bei der PM, seltener bei DM und IBM vor. Selten können die IIM mit Sarkoidose, Toxoplasmose oder viralen Infektionen (HIV, etc.) vergesellschaftet sein (57). Eine kardiale Beteiligung wurde bei bis zu 72% der Patienten mit PM und DM gefunden. Wichtig ist auch die Koinzidenz von Malignomen mit IIM, bei der PM und IBM seltener, dafür bei der DM mit 8-30% aber deutlich erhöht (84).

#### Jo-1-Syndrom mit Myositis:

Zusätzlich können beim Jo-1-Syndrom außer dem typischen symmetrischen Befall proximaler Muskelgruppen auch die Nacken- und Beckenmuskulatur beteiligt sein. Bei Beteiligung der Schlundmuskulatur kann es zu ausgeprägten Schluckstörungen kommen. Eher selten ist das Myokard beteiligt (72). Ein Großteil der Patienten entwickelt eine interstitielle Lungenerkrankung in Form einer fibrosierenden Alveolitis, die zu Reizhusten und Dyspnoe führen kann (52). Im unbehandelten Endstadium besteht eine Lungenfibrose (72).



**Abb. 01:** Ausschnitt aus einem CT- Thorax in Bauchlage in „High Resolution“-Technik. Darstellung von leicht ausgeprägten streifigen Veränderungen in den basalen Segmenten beidseits (Pfeile) als Ausdruck einer beginnenden fibrosierenden Alveolitis. CT- Thorax von einem Patienten mit Jo-1- Syndrom, dessen Muskelpräparat in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

Es kann zur Entwicklung einer rheumafaktornegativen Polyarthritiden kommen (66). Zusätzlich können vielfältige Symptome vorhanden sein, die man auch aus dem Formenkreis von Kollagenosen kennt, wie Raynaud-Phänomen, Sicca-Symptomatik und Teleangiectasien (72). Wie auch bei der DM kann es zur Ausbildung von „Mechanikerhänden“ kommen (5, 71).

### 1.2.2. Elektromyographische Befunde

Die elektromyographische Untersuchung zeigt bei allen IIM ein ähnliches Muster. In der akuten Phase einer Entzündung können Fibrillationen, positive scharfe Wellen, pseudomyotone und komplex repetitive Spontanentladungsmuster auftreten. Willkürpotentiale erscheinen aufgrund des Untergangs von Muskelfasern innerhalb motorischer Einheiten niedrigamplitudig und verkürzt sowie aufgesplittert. Im späteren Krankheitsverlauf bei PM, Jo-1-Syndrom und DM aber bereits im frühen Krankheitsverlauf bei der IBM kann es zu sekundären „neurogenen“ Veränderungen kommen. In einer quantitativen Studie wurde eine Korrelation zwischen EMG-Veränderungen und Krankheitsaktivität der PM und DM gefunden (69). Bei Genesung und dementsprechender Zunahme der Kraft waren Spontanentladungsmuster und myopathische Willkürpotentiale rückläufig.

### **1.2.3. Laborchemische Merkmale**

Obwohl nicht spezifisch, sind eine Erhöhung von CK und Myoglobin von einiger Bedeutung für die Diagnose der IIM. Die Serumkonzentration der CK ist ein sensitiver Indikator für die Schädigung der Muskulatur. Bei PM können bis 50-fach über der Norm liegende Werte vorkommen (84). Jedoch kann bei geringerem Gewebsuntergang die CK auch nur leicht erhöht oder im Normbereich sein. Bei DM und IBM kommen extrem erhöhte CK-Werte seltener vor. Eine HyperCKämie geht meist mit einer Erhöhung des Myoglobins einher. Teils kann die Erhöhung des Myoglobins einer CK-Erhöpfung vorausgehen (84). Weitere Parameter, wie die BSG, Aldolase und Aspartat-Amino-Transferase (ASAT) sind bei ungefähr der Hälfte aller Fälle von PM und DM erhöht, haben aber mangels Spezifität für die Diagnosestellung keine weitere Bedeutung (27, 25).

Die Bestimmung von Serum-Autoantikörpern kann ergänzend weitere Hinweise für eine Myositis liefern, hat aber vor allem Bedeutung für die Diagnose von „Overlap-Syndromen“ und dem Jo-1-Syndrom. Antinukleäre Antikörper (ANA) sind am häufigsten bei „Overlap-Syndromen“ erhöht (77%), kommen aber auch bei ca. 62% der Fälle mit DM, ca. 40% der Fälle mit PM und ca. 23% der Fälle mit IBM vor (52). Weitere myositisassoziierte Antikörper, wie dsDNA-Antikörper, Sm-Antikörper, etc. sind vor allem bei „Overlap-Syndromen“ nachzuweisen. Myositisspezifische Antikörper, wie Anti-SRP-Antikörper und Anti-Mi2-Antikörper treten in einigen Fällen von IIM auf und sollen eigene ME definieren (52).

### **1.2.4. Histologische Kennzeichen**

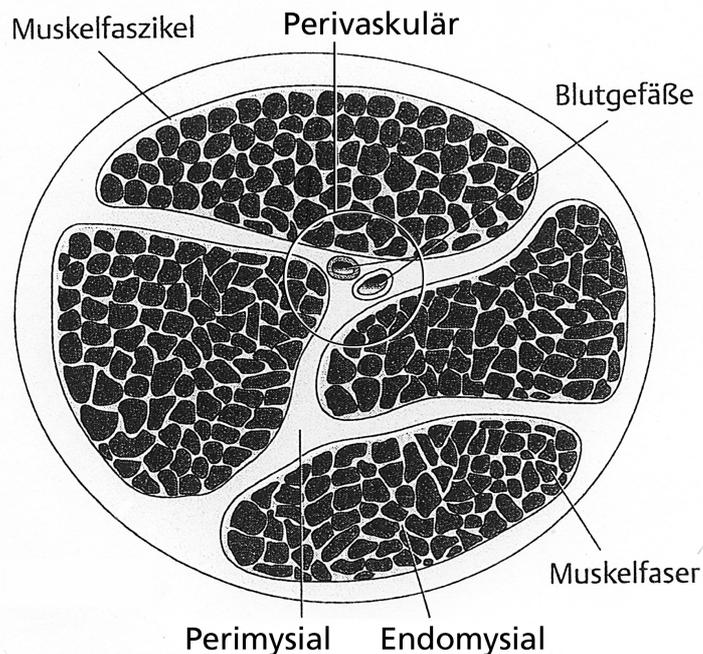
Einige lichtmikroskopisch fassbare Veränderungen sind unspezifisch, andere pathognomonisch für die Diagnosestellung einer PM, Jo-1-Syndrom, DM oder IBM. Elektronenmikroskopie erbringt zusätzliche Argumente und kann in einigen strittigen Fällen entscheidend sein, hat aber für die aktuellen Kriterien zur Diagnosestellung keine Bedeutung. Für die lichtmikroskopische Untersuchung werden die Muskelbiopsate erst in 2-10 µm dicke Schichten

geschnitten, anschließend auf einen Objektträger aufgetragen und gefärbt. Für die Standardfärbungen stehen verschiedene Färbelösungen zur Verfügung. Die wichtigste ist die Färbung mit Haematoxylin-Eosin (HE). Färbungen von Enzymen, wie der mitochondrialen Cytochrom-C-Oxidase (COX) können Enzymdefekte und somit Mitochondrienfunktionsanomalien aufdecken, spielen eine gewisse Rolle bei der Diagnose der IBM, werden aber in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt. Mit immunhistochemischen Färbemethoden können bestimmte Gewebe über Gewebsantigene sichtbar gemacht werden. Diese Methode ist entscheidend für die Identifizierung von Entzündungszellen im Muskelbiopsat.

Bei allen Muskelerkrankungen und auch bei PM, DM, Jo-1-Syndrom und IBM kommt es zu Muskelfaserkalibervariationen. Je weiter die Myopathie vorangeschritten ist, desto schwerer die Veränderungen im Muskelgewebe. Initial kommt es zu einer Schwellung der Muskelfasern, im Verlauf werden diese aber atrophisch. Man kann zwischen Einzelfasernekrosen oder gruppiert atrophischen Fasern unterscheiden. Bei Regeneration tauchen wieder hypertrophe, in der HE-Färbung vermehrt basophil erscheinende Muskelfasern auf. Die normal polygonal strukturierten Muskelfasern werden rund. Normalerweise liegen die Kerne subsarkolemmal, können bei einer Myopathie aber auch zentral liegen, vor allem bei Regenerationsprozessen. Je weiter die Atrophie vorangeschritten ist, desto mehr wird funktionsfähiges Muskelgewebe durch Bindegewebe oder Fettgewebe ersetzt. Zusätzlich können Entzündungszellen Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese stimulieren (81).

Nur bei Myositis und als Sekundärreaktion bei einigen Muskelerkrankungen (siehe Tab. 01) treten inflammatorische Zellinfiltrate auf. Diese erscheinen in der HE-Färbung als basophile Rundzellinfiltrate. Die Zellen können T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen sein. Sie treten endomysial, perimysial und perivaskulär auf. Endomysial ist der Bereich innerhalb eines Muskelfaszikels (Bündel von Muskelfasern). Das Perimysium besteht aus bindegewebigen Septen, die den Muskel in Faszikel unterteilt und die Faszikel umschließen. Entzündungszellen können im Perimysium, aber auch im angrenzenden Bereich, also am Rande der

Muskelfaszikel zwischen den Muskelfasern liegen. Perivaskulär ist der Bereich um größere, im Perimysium liegende Blutgefäße.



**Abb. 02:** Querschnitt durch einen Skelettmuskel. Darstellung von Muskelfaszikeln, Muskelfasern sowie möglicher Akkumulationszonen von Entzündungszellen (perivaskulär, perimysial, endomysial).  
(nach Zierz S, Jerusalem F (84))

Endomysial sieht man entweder kompakte Zellhaufen oder vereinzelt endomysial gelegene Entzündungszellen. Einige Zellen können auch die Wand von Venolen und Arteriolen infiltrieren. Makrophagen invadieren atrophische Muskelfasern und phagozytieren diese. Einige nicht-nekrotische Muskelfasern können ebenfalls durch Entzündungszellen invadiert werden. Für die Zuordnung zu PM, DM, Jo-1-Syndrom oder IBM sind die Akkumulationszonen der inflammatorischen Zellen und die Invasion nicht-nekrotischer Muskelfasern entscheidend. Kompakte Ansammlungen von Entzündungszellen kann man in der HE-Färbung leicht identifizieren, zur qualitativen Unterscheidung der Entzündungszellen und zum Nachweis einzelner diffus endomysial gelegener Zellen benötigt man jedoch immunhistologische Färbungen.

Spezifische Oberflächenantigene auf den verschiedenen Entzündungszellen können mittels Inkubation eines für dieses Epitop spezifischen Antikörpers sichtbar gemacht werden. So kann man zwischen T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen unterscheiden. Die Expression anderer Oberflächenantigene auf den Muskelfasern erleichtern ebenfalls die Diagnose

einer PM, DM, Jo-1-Syndrom oder IBM. Weiterhin kann man immunologisch aktive Proteine, wie Bestandteile des Komplementsystems damit sichtbar machen. Spezifische Epitope oder Gewebsmerkmale werden in der Immunologie auch als CD (Cluster of Differentiation) bezeichnet.

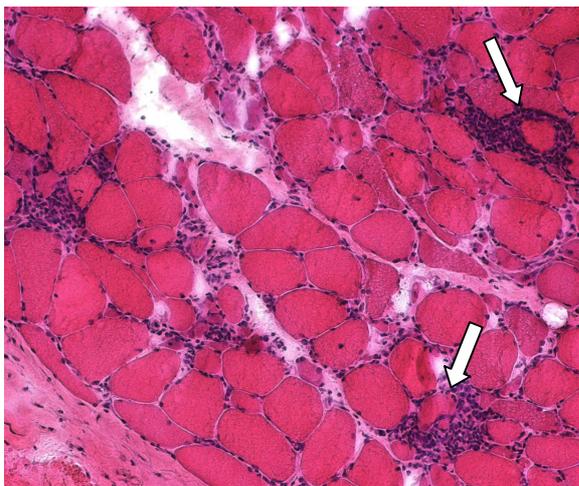
**Tab. 03: Wichtige Epitope zur Diagnostik der idiopathischen inflammatorischen Myopathien**

<b>Epitop</b>	<b>Gewebe</b>
CD4	T-Regulatorzellen
CD8	Zytotoxische T-Zellen
CD68	Makrophagen
CD20	Reife B-Lymphozyten
HLA-ABC (MHC-I)	Auf Oberfläche nahezu aller kernhaltiger Zellen des Organismus
C5b9	"Membrane Attack Complex" des Komplementsystems

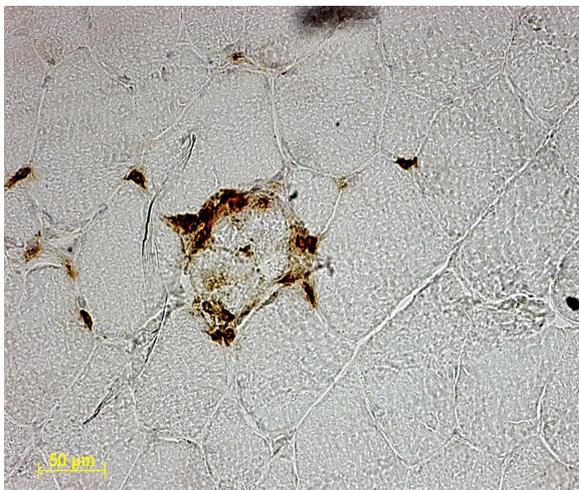
CD4 wird auf T-Regulatorzellen (T-Helfer-Zellen) exprimiert. Man bezeichnet diese Zellen auch als CD4<sup>+</sup>Zellen. HLA-ABC ist ein spezifisches Epitop des MHC-I. Dabei handelt es sich um den so genannten „major histocompatibility complex“ (54). Über MHC-I können Antigenfragmente präsentiert werden. CD8<sup>+</sup>Zellen werden dadurch aktiviert. Die vermehrte Expression von MHC-I spielt eine große Rolle bei der PM und IBM (77, 13, 17). MHC-I dient auch dem Schutz gesunder Zellen vor Zerstörung durch zytotoxische T-Zellen (45). CD20 ist ein spezifisches Protein auf der Oberfläche von B-Lymphozyten (35). CD68 wird auf Makrophagen exprimiert. Bei C5b9 handelt es sich um den so genannten „Membrane Attack Complex“ (MAC). Komplementablagerungen sind bei der DM in Muskelgefäßen nachweisbar. 1984 veröffentlichten Arahata und Engel erstmals quantitative Daten zur Verteilung mononukleärer Zellinfiltrate bei Myopathien (4). Vor allem auf dieser Arbeit basiert das heutige Verständnis zur Diagnostik mittels Verteilungsmuster von T- und B-Lymphozyten bei den IIM.

### Polymyositis:

Zusätzlich zu den bei allen IIM vorkommenden morphologischen Veränderungen gibt es bei der PM typische Befunde: Inflammatorische Zellen findet man einzeln (diffus endomysial) oder als kompakte Ansammlung (kompakt endomysial) überwiegend im Endomysium. Häufiger sieht man auch eine perivaskuläre Ansammlung von Entzündungszellen (60). Die Entzündungszellen können teilweise auch Muskelfasern umringen. Bei qualitativer Unterscheidung der Entzündungszellen handelt es sich vor allem um CD8<sup>+</sup>Zellen, weniger CD4<sup>+</sup>Zellen und B-Lymphozyten. Makrophagen invadieren atrophische Fasern und nicht-nekrotische Muskelfasern. Einzelne nicht-nekrotische Muskelfasern werden auch von CD8<sup>+</sup>Zellen invadiert (26). MHC-I ist auf den Muskelfasern überexprimiert. Das Vorkommen von MHC-I-Überexpression in Verbindung mit der Invasion nicht-nekrotischer Muskelfasern durch CD8<sup>+</sup>Zellen ist für die Diagnose einer PM pathognomonisch (17). Alle folgenden histologischen Abbildungen stammen von Patienten, die für diese Arbeit untersucht wurden.



Entzündungszellen (Pfeil unten rechts). Umringung einer einzelnen Muskelfaser durch eine kompakte Ansammlung von Entzündungszellen (Pfeil oben rechts).



**Abb. 03a: Polymyositis**, HE-Färbung, 1:10 vergrößert. Darstellung von entzündlichem endomysialem Infiltrat (kompakte Ansammlung von endomysial gelegenen mononukleären Zellen). Faserkalibervariation (hypertrophe und hypotrophe Fasern). Teils auch zentral gelegene Muskelfaserkerne. Bindegewebsvermehrung um die Muskelfasern herum. Zusätzlich Invasion einer nicht-nekrotischen Muskelfaser durch Entzündungszellen (Pfeil unten rechts). Umringung einer einzelnen Muskelfaser durch eine kompakte Ansammlung von Entzündungszellen (Pfeil oben rechts).

**Abb. 03b: Polymyositis**, Immunperoxidase-Färbung (braun) mit Anti-CD8-Antikörper. 1:20 vergrößert. Darstellung der Invasion einer nicht-nekrotischen Muskelfaser durch CD8<sup>+</sup>Zellen. Ebenfalls einzelne endomysial diffus verteilte CD8<sup>+</sup>Zellen.

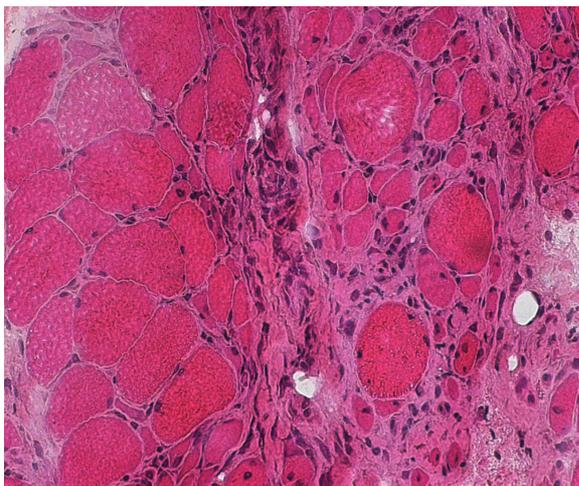


**Abb. 03c: Polymyositis**, Immunperoxidase-Färbung (braun) von MHC-I. 1:10 vergrößert. Nahezu gleichmäßig verteilte Überexpression von MHC-I in allen Muskelfasern.

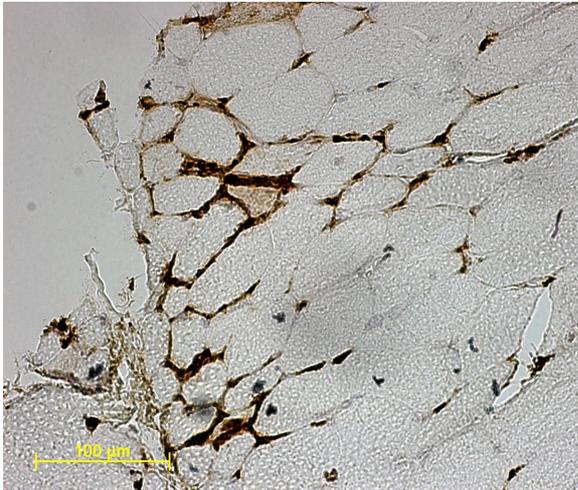
*Jo-1-Syndrom mit Myositis:*

Myopathologische Veränderungen umfassen überwiegend perimysiale Atrophie, Bindegewebsvermehrung und –fragmentation (60).

Entzündungszellen bestehen vor allem aus Makrophagen. Weiterhin kommen überwiegend CD8<sup>+</sup>Zellen, vor allem perimysial, weniger endomysial diffus verteilt vor. Kompakte Ansammlungen von Entzündungszellen und Invasion nicht-nekrotischer Muskelfasern sind eher selten. Im Gegensatz zur DM und PM ist eine perivaskuläre Entzündungsreaktion selten. MHC-I-Überexpression ist vorhanden, aber weniger ausgeprägt als bei der PM.



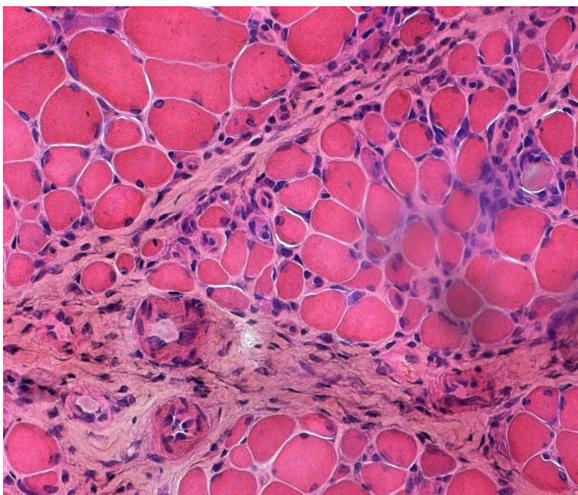
**Abb. 04a: Jo-1-Syndrom**, HE-Färbung, 1:20 vergrößert. Darstellung von überwiegend perimysial gelegenem entzündlichem Infiltrat (mononukleäre Zellen). Überwiegend perimysial benachbarte Atrophie von Muskelfasern sowie einzelne hypertrophe und hypotrophe Muskelfasern.



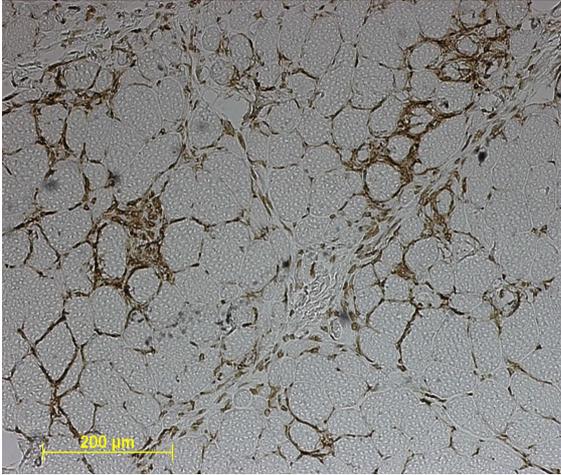
**Abb. 04b: Jo-1-Syndrom**, Immunperoxidase-Färbung von Makrophagen mit CD68-Antikörpern (braun), 1:20 vergrößert. Überwiegend perimysial gelegene Makrophagen. Dort auch Bindegewebsfragmentation und gruppierte Atrophie angrenzender Muskelfasern.

### Dermatomyositis:

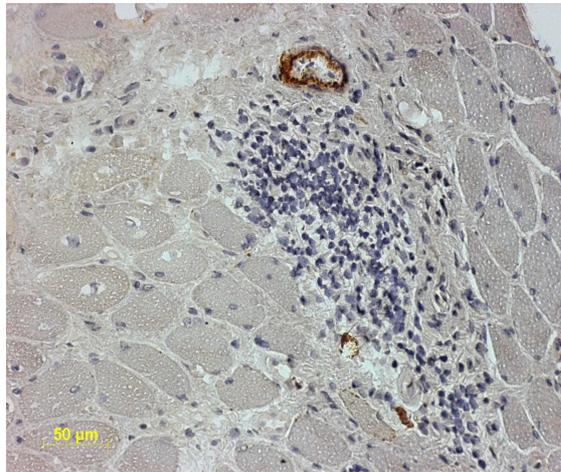
Bei der DM kommt es neben Faserkalibervariationen, Atrophie und Nekrose zu gruppiert perimysial Atrophie. Diese perimysiale Atrophie der Muskelfasern ist wichtigstes diagnostisches Kriterium für die Diagnose einer DM (14). Entzündungszellen bestehen hauptsächlich aus  $CD4^+$ Zellen und B-Lymphozyten. Akkumulationszonen sind perimysial und perivaskulär, selten endomysial (26). In den Muskelgefäßen kann man C5b9-Komplementablagerungen finden. Zusätzlich kann es einer Schwellung von Endothelzellen und Muskelkapillaren kommen.



**Abb. 05a: Dermatomyositis**, HE-Färbung, 1:20 vergrößert. Darstellung von überwiegend perimysial gelegenen sowie perivaskulärem Infiltrat. Perimysiale Atrophie und Hypotrophie der Muskelfasern. Entzündliches Infiltrat und Schwellung der Endothelzellen der perimysialen Blutgefäße. Leichte perimysiale Bindegewebsvermehrung.



**Abb. 05b: Dermatomyositis,**  
Immunperoxidase-Färbung von CD4<sup>+</sup>Zellen (braun), 1:10 vergrößert. Infiltration von CD4<sup>+</sup>Zellen überwiegend perimysial und in angrenzenden Bereichen.

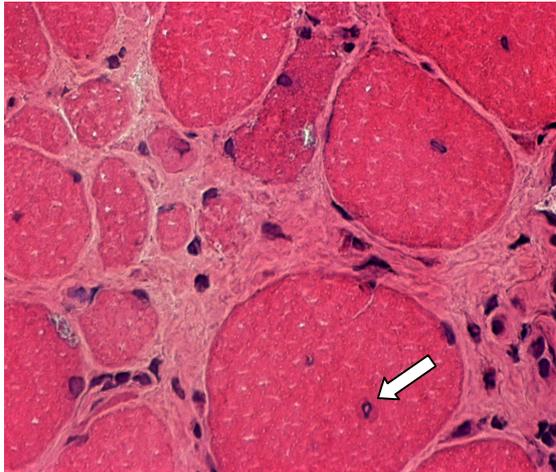


**Abb. 05c: Dermatomyositis,**  
Immunperoxidase-Färbung mit anti-C5b9-MAC-Antikörpern, Gegenfärbung mit Mayer`s Hämalaun-Lösung (Zellkerne blau), 1:20 vergrößert. Darstellung von braunen C5b9-MAC-Ablagerungen an Endothelzellen eines perimysialen Gefäßes. Zusätzlich perivaskuläres und perimysiales Infiltrat.

### Einschlußkörpermyositis:

Wie bei allen anderen IIM kommt es zu morphologischen Veränderungen. Ähnlich wie bei der PM werden nicht-nekrotische Muskelfasern ohne „Rimmed Vacuoles“ durch CD8<sup>+</sup>Zellen invadiert (16). Entzündliches Infiltrat findet sich vor allem endomysial diffus, weniger endomysial kompakt. Typisch ist auch eine MHC-I-Überexpression der Muskelfasern (18). In einigen Muskelfasern sieht man so genannte „Rimmed Vacuoles“, Vakuolen mit basophilem Randsaum. Zusammen mit den klinischen Merkmalen sind „Rimmed Vacuoles“ für die IBM pathognomonisch. Bei unklarem Befund, wie dem Fehlen von „Rimmed Vacuoles“ kann man noch andere Färbungen durchführen, wie die der Cytochrom-C-Oxidase (COX), einem mitochondrialen Enzym. Bei der IBM sieht man übermäßig viele COX-negative Fasern (18). In der Kongorot-Färbung kann man „Alzheimer“-ähnliche Amyloidproteine in einigen Muskelfasern sehen.

Elektronenmikroskopisch kann man typische, 15-18 nm große, nukleäre oder zytoplasmatische tubulo-filamentöse Einschlüsse finden.



**Abb. 06: Einschlusskörpermyositis**, HE-Färbung, 1:40 vergrößert. Darstellung von endomysial gelegenem entzündlichem Infiltrat (einzelne diffus verteilte mononukleäre Zellen). Daneben atrophe und hypotrophe Muskelfasern. Teils hypertrophe Fasern mit zentral gelegenen Zellkernen. In der unteren Faser Spaltbildung und eine „Rimmed Vacuole“ (Pfeil).

### 1.3. Immunpathologischer Hintergrund

Wie kommt es eigentlich zur Entstehung der autoimmunen inflammatorischen Myopathien? Jeder Lymphozyt hat einen Antigenrezeptor einzigartiger Spezifität. Im Thymus und Knochenmark kommt es zu einem zufälligen Rearrangement der Gene für den Antigenrezeptor, so kann es auch zur Entstehung von Rezeptoren kommen, die gegen ein Autoantigen gerichtet sind. Ein geringer Grad an Autoreaktivität ist aber wohl für die Entstehung eines breiten Antigenrezeptor-Repertoires unablässig (23, 30, 21). Verschiedene Mechanismen verhindern die Aktivierung und Verbreitung autoreaktiver Lymphozyten und somit die Entstehung einer Autoimmunerkrankung: Lymphozyten, die ein „Selbst-Antigen“ erkennen, erhalten entweder einen neuen Antigenrezeptor, es kommt zur Apoptose oder autoreaktive Lymphozyten werden in einen Ruhezustand überführt. Dieser Ruhezustand ist nur möglich, wenn autoreaktive Lymphozyten bei der Entstehung nicht einem „Selbst-Antigen“ chronisch ausgesetzt sind, wie das im Thymus oder Knochenmark der Fall sein kann (44). Falls diese ruhenden autoreaktiven Lymphozyten aber aus irgendeinem Grund nun einem ihrem Rezeptor entsprechenden Autoantigen ausgesetzt werden, kommt es entweder zur Apoptose oder bei Versagen dieses Mechanismus zur

Entstehung einer Autoimmunkrankheit. Verschiedene Hypothesen wurden zur Entstehung der IIM veröffentlicht: Nach Infektion mit einem Antigen, das einem muskulären „Selbst-Antigen“ ähnlich ist, kommt es zur Kreuzreaktion. Dies wird als molekulares Mimikry bezeichnet (27). Virale oder bakterielle Infektionen könnten durch molekulares Mimikry die Selbsttoleranz stören und zur Expression von Autoantigenen führen, wie dies beim Guillain-Barré-Syndrom gezeigt wurde (65). Bei den IIM konnten zwei PCR-Studien keine virale DNS nachweisen (49, 50). Dalakas MC et al. entdeckten in Muskelbiopsaten von 4 HIV-positiven Patienten, die eine IBM entwickelten, dass eine Untergruppe von autoinvasiven CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten virusspezifisch war (20).

Eine andere Hypothese zur Entstehung der IIM wäre eine Freisetzung von Autoantigenen aus beschädigten Muskelfasern, die zu einer Aktivierung autoaggressiver Immunzellen führen könnten oder zu einer unspezifischen Bindung von viral induzierten Superantigenen an T-Lymphozyten (1). Eine virale Infektion könnte auch die Expression von muskulären Autoantigenen induzieren (27). Außer beim Jo-1-Syndrom bleibt das primäre Antigen noch unbekannt, das zur Entwicklung von PM, IBM oder DM führt (62, 15, 17). Erschwerend für die Identifikation kommt das so genannte „Epitope Spreading“ hinzu. Durch Verarbeitung von Peptidfragmenten des primären Autoantigens durch Immunzellen, können neue Peptidfragmente anderen Immunzellen präsentiert werden und somit die Zahl an Autoantigenen vergrößert werden, die eine Immunreaktion hervorrufen (21).

PM und DM gelten als autoimmune Erkrankungen. Bei der IBM spielen zusätzlich degenerative Vorgänge eine Rolle (18). Die genaue Pathogenese ist unklar. In einer Übersichtsarbeit beschreibt Dalakas MC die aktuellen Vorstellungen zur molekularen Pathogenese von PM, DM und IBM (17). Die Annahme einer autoimmunen Pathogenese stützt sich auf die Assoziation mit verschiedenen Kollagenosen, T-Zell-vermittelter Myotoxizität und Ansprechen der Erkrankungen auf immunmodulatorische Therapien. Verschiedene myositisassoziierte Autoimmunantikörper können im Serum der Erkrankten gefunden werden. Einige genetische Risikofaktoren (Assoziation bestimmter Myositsformen mit bestimmten HLA-Haplotypen) für die Erkrankung an PM,

Jo-1-Syndrom, DM und IBM wurden auch beschrieben (27). Bei PM und IBM kommt es vor allem zu einer zellvermittelten Immunreaktion. Eine Schlüsselrolle spielt dabei MHC-I (47, 77). Über MHC-I werden Autoantigene präsentiert (1, 15). Muskelfasern exprimieren normalerweise kein MHC-I (61). Proinflammatorische Zytokine können aber eine Überexpression auslösen (59, 17). Muskelfasern werden so zu antigenpräsentierenden Zellen (38). Neben MHC-I exprimieren die Muskelfasern andere Adhäsionsmoleküle, die das Andocken von T-Lymphozyten erleichtern (39). Autoaggressive CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen ein oder mehrere Autoantigene, die auf der Oberfläche der Muskelfasern mittels MHC-I präsentiert werden (11). Damit wird der Entzündungsprozess in Gang gesetzt. Es kommt zur Expression von Granzym und Perforin, Enzymen, die die Muskelfaserwand schädigen und zur Nekrose der Muskelfaser beitragen (29). Eine weitere Zellschädigung könnte durch eine chronische Hochregulierung von MHC-I entstehen, indem die Funktion des endoplasmatischen Retikulums gestört wird (62).

Es gibt mehrere Hinweise darauf, daß sich die Entzündungsreaktion bei PM und IBM gegen ein bestimmtes Autoantigen richtet: Perforin richtet sich bei der PM vektoriell gegen die Muskelfaser, bei der DM wird Perforin eher unspezifisch aktiviert (29). Mehrere Studien zeigten bei der PM und IBM eine oligoklonale Expansion der T-Zellen und daß diese sowohl im Muskel als auch im Blut zu finden ist (2, 24, 34, 55). Zu einer oligoklonalen Expansion kommt es nur, wenn die Immunreaktion gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet ist. Es wurde gezeigt, daß in Myoblastenkulturen von Patienten mit PM die T-Zell-Rezeptoren gegen ein zytosolisch vorkommendes Protein gerichtet sind (82). Nach der Aktivierung setzen T-Zellen Zytokine und Chemokine frei. Dies lockt weitere Entzündungszellen an, erleichtert die Transmigration von Lymphozyten aus Blutgefäßen und verstärkt die Entzündungsreaktion. Die Ausschüttung von Matrix-Metalloproteinasen erleichtert zum Beispiel die Migration von Entzündungszellen durch die extrazelluläre Matrix (10, 17). Beim Jo-1-Syndrom ist die Histidyl-tRNA-Synthetase das Antigen, gegen das die Entzündungsreaktion gerichtet ist.

Bei der DM spielt vor allem eine gegen Endothelzellen der intrakutanen und perimysialen kaliberstärkeren Arteriolen, Venolen und Kapillaren gerichtete

Immunreaktion eine Rolle (11). Durch den „Membrane Attack Complex“, Teil des Komplement-Systems, kommt es zu einer Nekrose der Endothelzellen, letztendlich zu einer Obliteration der Blutgefäße. Dies führt zu Mikroinfarkten und Reduktion der Anzahl an Kapillaren, konsekutiv zu einer ischämisch bedingten Atrophie von an das Perimysium angrenzender Muskelfasern (15, 40). Adhäsionsmoleküle, wie ICAM und VCAM werden auf Endothelzellen exprimiert. Dies soll die Transmigration von Lymphozyten aus Blutgefäßen erleichtern und ist Teil der Entzündungsreaktion (13, 22). Die Entzündungsreaktion ist überwiegend humoral (27).

Greenberg SA et al. zeigten in Muskelbiopsaten von Patienten mit PM, DM und IBM durch immunhistochemische Identifikation von B-Lymphozyten und Plasmazellen, dass bei der PM und der IBM wesentlich mehr Plasmazellen als B-Lymphozyten vorkommen. Da letztendlich Plasmazellen Antikörper bilden und für die humorale Immunantwort verantwortlich sind, war die Schlussfolgerung, dass humorale Immunmechanismen bei der Pathogenese von PM und IBM eine wesentlich größere Rolle spielen, als bisher angenommen wurde.

Plasmazellen entsprechen dem Stadium der letzten Differenzierung von B-Lymphozyten (B-Zellen). Plasmazellen sind die einzigen Zellen, die in der Lage sind, Antikörper zu sezernieren (64). B-Zellen entstehen aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Reife B-Zellen verlassen das Knochenmark, zirkulieren im Blut und in sekundären lymphatischen Organen. B-Lymphozyten können entweder in sekundären lymphatischen Organen, wie Lymphknoten oder in den Zielorganen durch Binden des membrangebundenen B-Zellrezeptors an ein Antigen oder durch chemische Signale aktiviert werden (68).

Einer der membrangebundenen B-Zellrezeptoren ist CD20, welches früher B1 genannt wurde (31). Arahata K und Engel AG benutzten immunhistochemische Färbungen mit dem B1-Antikörper zur Identifizierung von B-Zellen (4, 74). CD20 ist ausschließlich auf Prä-B-Zellen und reifen B-Lymphozyten zu finden. Zwei Studien zeigten, dass CD20 nach Aktivierung von B-Lymphozyten und Differenzierung zu Plasmazellen verloren geht (3, 68). CD 138 (Syndecan) ist ein membranständiges Proteoglykan, das an ein

interstitielles Kollagen bindet. CD138 auf Zellen hämatopoietischen Ursprungs kann ausschließlich auf Prä-B-Zellen im Knochenmark und Plasmazellen gefunden werden (68). Reife B-Zellen und T-Zellen (T-Lymphozyten) exprimieren kein CD138 (31, 67).

## **2. Fragestellung**

In dieser Arbeit sollten Plasmazellen und B-Lymphozyten bei PM, Jo-1-Syndrom, DM und IBM in definierten Akkumulationszonen perivaskulär, perimysial und endomysial analysiert werden. Aufgrund des Vorkommens der Plasmazellen oder B-Lymphozyten als kompakte Ansammlung oder vereinzelt (bis maximal 3 Entzündungszellen auf einmal) kann man noch unterscheiden zwischen endomysial kompakt und endomysial diffus. Die Entzündungszellen sollten gezählt und die Ergebnisse statistisch aufgearbeitet werden, um Hinweise auf die Pathophysiologie und Pathogenese der untersuchten IIM zu erhalten.

## **3. Patienten**

Es wurden 23 Patienten (siehe Tab. 04) mit der klinisch, laborchemisch, elektromyographisch und histologisch gesicherten Diagnose einer PM, Jo-1-Syndrom, DM oder IBM untersucht. Es wurde darauf geachtet, daß die Patienten mindestens 4 Monate vor Muskelbiopsie keinerlei immunmodulierende Medikamente erhielten. Es konnten 7 PM-Fälle, 4 Fälle mit Jo-1-Syndrom, 6 Fälle mit DM und 6 IBM-Fälle identifiziert werden. Es wurden nur solche Biopsien analysiert, die in Übereinstimmung mit der Diagnose eindeutige histopathologische Veränderungen zeigten und frei von Gefrierartefakten waren. Die untersuchten Patienten wurden laufend durchnummeriert. Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten mit DM hatten typische Hautveränderungen. Alle in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten hatten elektromyographisch pathologische

Spontanaktivität in den betroffenen Muskelgruppen sowie myopathische Willküraktivität. Alle Patienten mit PM hatten eine Tetraparese mit proximaler Betonung. Beim Jo-1-Syndrom hatte Patient 9 eine proximal betonte Paraparese der Beine, die Patienten 8, 10 und 11 hatten eine proximal betonte Tetraparese. Bei der DM hatten Patient 12 und Patient 16 eine ausgeprägte proximal betonte Paraparese der Beine. Die Patienten 13 bis 15 und Patient 17 der DM hatten eine Tetraparese mit proximaler Betonung. Bei der IBM hatte lediglich Patient 19 eine Tetraparese mit proximaler Betonung. Die Patienten 18 sowie 20 bis 23 litten an einer Tetraparese mit distaler Betonung der oberen Extremitäten und proximaler Betonung der unteren Extremitäten. Bei den Patienten mit Jo-1-Syndrom waren alle Jo-1-Antikörper-Ratios (normal  $< 1$ ) erhöht. Bei Patient 8 und 9 war diese Ratio bei 7,9, bei Patient 10 bei 7,5 und bei Patient 11 bei 2,4.

**Tab. 04: Klinische und laborchemische Merkmale der Patienten**

m = männlich; f = weiblich; j = Jahre; CK = Creatinkinase. ILE = interstitielle Lungenerkrankung; rh. Arthritis = rheumatoide Arthritis MW +/- SD = Mittelwert +/- Standardabweichung;

Patient (m/f)	Alter bei Muskelbiopsie (j)	Dauer der Erkrankung vor Muskelbiopsie (j)	Myalgien	Dysphagie	Assoziierte Erkrankungen	CK (normal < 2,4 µmol/l)
<b>Polymyositis</b>						
1 (m)	70	2	nein	nein	-	42,4
2 (f)	33	1	ja	nein	-	35
3 (f)	71	2	nein	nein	-	29,1
4 (m)	71	6	nein	nein	-	20,1
5 (f)	60	9	ja	nein	-	11,9
6 (f)	63	1	nein	ja	M. Basedow	9,5
7 (f)	77	1	nein	nein	-	24,2
<i>MW +/- SD</i>	63,6 +/- 14,6	3,1 +/- 3,1				24,6 +/- 11,9
<b>Jo-1-Syndrom</b>						
8 (f)	59	1	ja	nein	ILE	17,8
9 (m)	33	2	ja	nein	ILE	18,5
10 (m)	56	1	ja	nein	ILE	75,1
11 (f)	39	1	ja	nein	-	127
<i>MW +/- SD</i>	46,8 +/- 11	1,3 +/- 0,4				59,6 +/- 45,3
<b>Dermatomyositis</b>						
12 (f)	54	10	nein	nein	-	8,6
13 (f)	71	0,125	ja	ja	-	61,9
14 (f)	37	10	nein	nein	Systemische Vaskulitis	2,9
15 (f)	76	0,08	nein	ja	Adenokarzinom Magen	8,1
16 (f)	73	0,04	ja	nein	Pankreas-karzinom	109,88
17 (m)	75	1,5	nein	nein	Prostata-karzinom	11,42
<i>MW +/- SD</i>	64,3 +/- 14,3	3,6 +/- 4,2				33,8 +/- 36,5
<b>Einschlußkörpermyositis</b>						
18 (m)	63	2	nein	ja	-	2,9
19 (m)	77	1	ja	ja	-	4,2
20 (f)	57	4	nein	nein	rh.Arthritis, M.Basedow	5,3
21 (f)	58	5	nein	nein	-	7,4
22 (m)	76	11	nein	nein	M.Hashimoto	10,1
23 (f)	52	2	nein	nein	-	19,2
<i>MW +/- SD</i>	63,8 +/- 9,5	4,2 +/- 3,3				8,2 +/- 5,4

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Firma</i>
3,3'-Diaminobenzidin-Tabletten	SIGMA
Aceton	FLUKA
Aqua bidest	BRAUN
BSA (albumine bovine fraction V, pH 7,0)	SERVA
Ethanol reinst (100%)	ROTH
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MERCK
HCl	MERCK
Histofine	NICHIREI BIOSCIENCE
Kaiser's Glycerin-Gelatine	MERCK
KCl	MERCK
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MERCK
Mayer's Hämalaun	MERCK
Methanol	MERCK
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	MERCK
NaCl	APPLICHEM
NaOH	ROTH
Nylonfilter 0,22µm	ROTH
Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger	MENZEL
Roti Histokitt II	ROTH
TRIS-(Hydroxymethyl-Amino-Methan)	ROTH
Xylol	ROTH

#### 4.1.2. Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Menge</i>	<i>Firma</i>
Biotin-markierter Antikörper IgG	0,5mg/ml	KPL

(Ziege-anti-Maus)		
CD4 monoklonaler Antikörper IgG1 (Maus-anti-Mensch)	100µg/ml	DAKO
CD8 monoklonaler Antikörper IgG1 (Maus-anti-Mensch)	50µg/ml	DAKO
CD20 monoklonaler Antikörper IgG2a (Maus-anti-Mensch)	175µg/ml	DAKO
CD68 monoklonaler Antikörper IgG1 (Maus-anti-Mensch)	460µg/ml	DAKO
CD138 monoklonaler Antikörper IgG1 (Maus-anti-Mensch)	90µg/ml	DAKO
HLA-ABC (Anti-MHC-I) (Maus-anti-Mensch)	175µg/ml	DAKO
Negativkontrolle für Maus IgG1 (Maus-anti-Mensch)	200µg/ml	LAB VISION
Negativkontrolle für Maus IgG2a (Maus-anti-Mensch)	200µg/ml	LAB VISION

#### 4.1.3. Fluoreszenzfarbstoffe

<i>Farbstoff</i>	<i>Menge</i>	<i>Firma</i>
Cy3-markiertes Streptavidin (Cy3)	1mg/ml	KPL
Fluoreszein-markiertes Streptavidin (FITC)	1mg/ml	KPL

#### 4.1.4. Herstellung der benutzten Lösungen

0,05 M TRIS-Puffer pH 7,6:

12,2 g TRIS in 300ml Aqua bidest lösen, pH einstellen auf pH 7,6 mit 1N HCL, auf 2000ml auffüllen.

7,9 M PBS-Puffer pH 7,4:

8g NaCl, 0,2g KCl, 1,15g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit Aqua bidest auf 1000ml auffüllen; pH auf 7,4 einstellen mit HCl oder NaOH.

70% Alkohollösung:

700 ml Alkohol 100% + 300 ml Aqua dest.

96% Alkohollösung:

960ml Alkohol100% + 40ml Aqua dest.

Mayer's Hämaun-Lösung:

125ml Mayer's Hämaun-Konzentrat + 475ml Aqua dest.

#### **4.1.5. Geräte**

<i>Gerät</i>	<i>Firma</i>
Axiocam HRc <sup>®</sup>	ZEISS
Filtersatz für Immunfluoreszenzfärbung Nr. 10 und 15	ZEISS
Mikroskop ZEISS Axioplan <sup>®</sup>	ZEISS
Mikroskopleuchte HBO 50 <sup>®</sup> , Quecksilberdampfampe	ZEISS
Okulare: ZEISS Plan-NEOFLUAR <sup>®</sup> 5x, 10x, 40x, 100x	ZEISS
Rotationsmikrotom 2045C, Kryostat CM 3000 <sup>®</sup>	JUNG

#### **4.1.6. Software**

<i>Software</i>	<i>Firma</i>
AxioVision 3.1 <sup>®</sup> Bildanalysesoftware	ZEISS
Origin 6.1G <sup>®</sup>	ORIGINLAB CO.
Statistica für Windows, Version 5.1 <sup>®</sup>	STATSOFT INC.
QuarkXPress, Version 5.01 <sup>®</sup>	QUARK, INC.

#### **4.2. Methoden**

##### **4.2.1. Muskelbiopsien**

Muskelbiopsien wurden offen durchgeführt. Nach einem ca. 1,5 bis 2 cm langen Hautschnitt wurde nach Spalten der Muskelfaszie ein ca. 1 cm<sup>3</sup> großes Muskelstück entnommen. Für die histologischen Untersuchungen wurde das Muskelgewebe mit einem Tropfen Einbettmedium auf einem Korkplättchen so ausgerichtet, daß die Längsrichtung der Muskelfasern senkrecht zum

Korkplättchen war. Zur Aufbewahrung wurde das so vorbereitete Muskelbiopsat langsam in eiskaltes 2-Methylbutan getaucht und ca. 1 Minute geschwenkt. Dadurch sollte das Muskelstück fixiert und dem Gewebe sämtliche Flüssigkeit entzogen werden. Das 2-Methylbutan wurde vorher mittels flüssigen Stickstoffs bis nahe der Vereisungsgrenze gekühlt. Die so behandelte Muskelprobe wurde nach Einfrieren in einem Plastikgefäß zur Langzeitaufbewahrung in ein Behältnis mit flüssigem Stickstoff gegeben.

#### **4.2.2. Färbungen**

In der routinemäßigen Diagnostik wurden folgende Färbungen durchgeführt: HE, ATP (pH 9,4/4,6/4,2), NADH, SDH, Gomori-Trichrom, Sudanschwarz, COX-SDH, Kongorot, Saure Phosphatase, PAS, AMPD, sowie immunhistochemische Färbungen mit CD45RB (LCA, Leucocyte Common Antigen), CD22 (BCA, B Cell Common Antigen), CD45 RO (TCA, T Cell Common Antigen), C5b9.

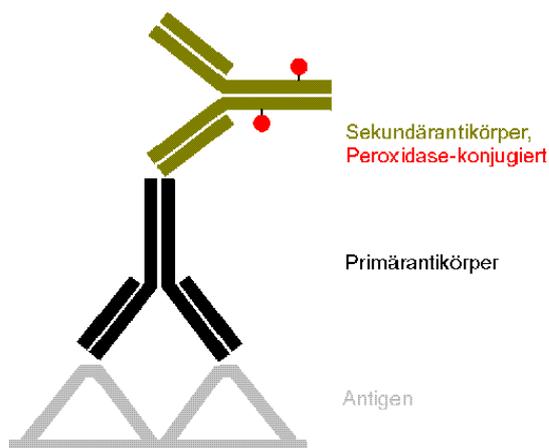
In der vorliegenden Arbeit wurden bei allen 23 Patienten folgenden zusätzliche immunhistochemische Färbungen durchgeführt: CD4, CD8, CD68, HLA-ABC (MHC-I), CD20 und CD138.

Für die neu durchgeführten immunhistochemischen Färbungen wurden die eingefrorenen Muskelbiopsate aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei  $-20^{\circ}$  Celsius mit einem Rotationsmikrotom senkrecht zur Muskelfaserlängsrichtung geschnitten. Zur besseren Haftung des Schnitts wurden Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger benutzt. Objektträger wurden von 1 bis 6 beschriftet. Die Schnitte wurden streng in ihrer Reihenfolge auf die Objektträger gegeben. Damit wurde für die spätere Auszählung von CD20- und CD138-positiven Zellen gewährleistet, dass in etwa gleiche Bereiche des Muskels vorliegen und zur Auswertung kommen. Das heißt, angrenzende Schnitte waren nur 2  $\mu\text{m}$  voneinander entfernt (4). Nach Antrocknen des Schnitts wurde der Objektträger 10 Minuten bei Raumtemperatur in Aceton fixiert, anschließend an der Luft getrocknet. Sofern keine sofortige Weiterverarbeitung erfolgte, wurde der Objektträger mit Aluminium-Folie umwickelt und anschließend bei  $-80^{\circ}$  Celsius

eingefroren. Zu jeder Färbungsreihe wurden Negativkontrollen und Positivkontrollen mitgeführt. Je nach Antikörper bestand die Färbung einer Negativkontrolle aus der Zugabe von nicht spezifisch bindendem Immunglobulin, IgG-Subklasse 1 oder 2a. Als Kontrollen dienten Gewebe aus der menschlichen Tonsille (n= 3) oder aus menschlichem Muskel von Patienten ohne Muskelerkrankungen („gesunder Muskel“, n = 3).

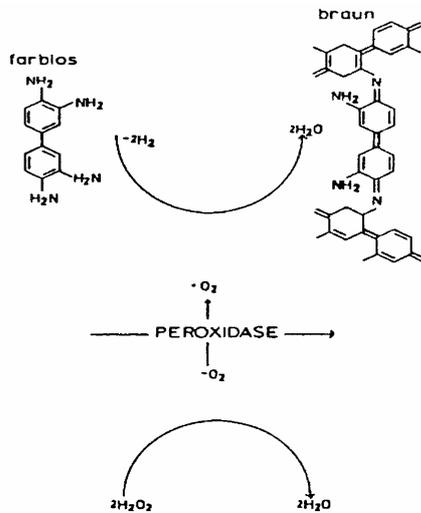
Indirekte Färbemethode mit der Peroxidase-Anti-Peroxidase-Reaktion (PAP):

Gefärbt wurden mit dieser Methode CD4, CD8, CD68, MHC-I, CD20, CD138. Bei dieser Methode wird nach Inkubation mit dem Primärantikörper in einem zweiten Schritt ein weiterer Antikörper (Sekundärantikörper) hinzugegeben, der sich gegen den ersten Antikörper richtet. Der Primärantikörper richtet sich gegen ein spezifisches Epitop (in der vorliegenden Arbeit gegen ein menschliches Epitop). Hierfür wurden Antikörper von der Maus verwendet. Der Sekundärantikörper wurde nach Immunisierung aus Ziegenserum hergestellt und ist gegen Maus-Immunglobuline gerichtet. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt.



**Abb. 07:** Indirekte PAP-Färbemethode: Nach Binden des Primärantikörpers an ein spezifisches Epitop Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper

Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid wird eine Enzym-Substrat-Reaktion ausgelöst, welches durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen das farblose Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) durch eine Oxidation in einen bräunlichen Farbstoff umwandelt.



**Abb. 08:** Umwandlung des farblosen Chromogens 3,3'-Diaminobenzidins (DAB) in einen bräunlichen Farbstoff mittels Oxidation durch das Enzym Peroxidase. Start der Reaktion durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Die bei  $-80^\circ$  Celsius eingefrorenen Objektträger wurden langsam auf Zimmertemperatur gebracht. Die zur Färbung bereitgestellten Schnitte wurden kurz in TRIS-Puffer rehydriert. Nach Ablauf des TRIS-Puffers wurden die Präparate 20 min. in einem  $\text{H}_2\text{O}_2$ /Methanol-Bad inkubiert. Dieses diente zur Blockierung der endogenen Peroxidase, verminderte eine unspezifische Hintergrundanfärbung und erhöhte die Anfärbung der spezifisch gebundenen Primärantikörper. Nach der Inkubation im  $\text{H}_2\text{O}_2$ /Methanol-Bad wurden die Präparate nochmals mit TRIS-Puffer gespült und 5 Minuten in diesen Puffer eingestellt, damit die vorherige Lösung komplett ausgewaschen wird. Es folgte eine 30 Minuten lange Inkubation mit dem primären Antikörper gegen folgende Antigene: CD20, CD138, CD4, CD8, HLA-ABC (MHC-I) und CD68. Die Verdünnung der Primärantikörper, die ein optimales Färberegebnis bot, wurde in Vorversuchen an Tonsillengewebe getestet. Das Färberebild sollte weder zu viel Hintergrundfärbung aufzeigen, noch zu blass ausfallen.

Zur Kontrolle einer korrekten Anfärbung und Frage nach Hintergrundfärbung wurden Positivkontrollen und Negativkontrollen an Präparaten aus menschlicher Tonsille durchgeführt. In der Tonsille kommen sowohl B-Lymphozyten als auch Plasmazellen vor, somit eignet sich Tonsille hervorragend als Kontrollgewebe. Zur Überprüfung, ob es zu unspezifischer Bindung von Immunglobulinen kam, wurde der Antikörperklasse von CD20 und CD138 entsprechend anstatt CD20 IgG2a und anstatt CD138 IgG1 als

Primärantikörper verwendet. Verdünnungen der Negativantikörper wurden so gewählt, dass eine Übereinstimmung zur Konzentration der Primärantikörper entstand.

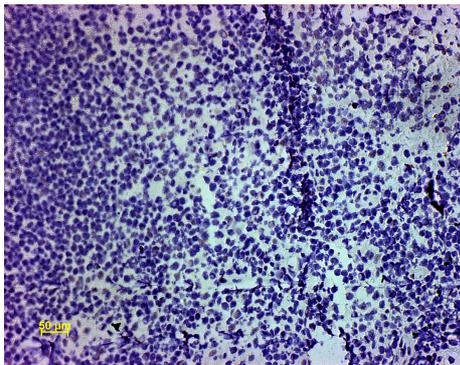
**Tab. 05: Benutzte Antikörper, Konzentrationen und Verdünnungen für die PAP-Färbung**

<i>Primärantikörper Zielantigen</i>	<i>IgG-Konzentration Primärantikörper</i>	<i>Primärantikörper Verdünnung</i>	<i>Negativkontrolle</i>	<i>IgG-Konzentration Negativkontrolle</i>	<i>Negativkontrolle Verdünnung</i>
CD20	450 µg/ml	1:700	IgG2a	200 µg/ml	1:311
CD138	90 µg/ml	1:50	IgG1	200 µg/ml	1:111
HLA-ABC	175 µg/ml	1:250	IgG2a	200 µg/ml	1:286
CD4	100 µg/ml	1:80	IgG1	200 µg/ml	1:160
CD8	200 µg/ml	1:80	IgG1	200 µg/ml	1:80
CD68	460 µg/ml	1:250	IgG1	200 µg/ml	1:109

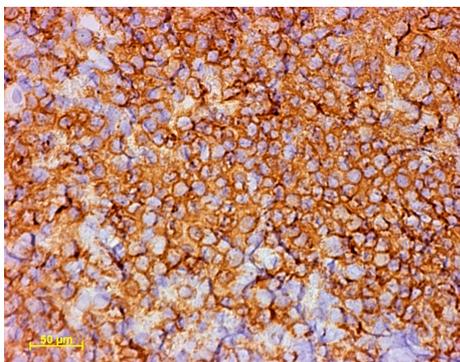
Die folgenden Inkubationsschritte wurden in einer so genannten „feuchten Kammer“ durchgeführt (36). Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper folgte das Abspülen der Antikörper-Lösung mit TRIS-Puffer sowie 3 Mal für je 10 Minuten Einstellung in TRIS-Puffer. Dadurch sollten alle nicht gebundenen Antikörper entfernt werden.

Nach dem Waschen folgte die nächste Inkubation für 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper (Histofine). Dieser gegen Maus-Epitope gerichtete Antikörper war mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt. Nach erfolgter Inkubation wurde wiederum gewaschen. Währenddessen wurde die DAB-Lösung hergestellt. DAB lag in Tablettenform zu jeweils 10mg vor. 2 Tabletten wurden in 20ml TRIS-Puffer gelöst. Dazu wurde verdünntes Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gegeben (200 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf 5,8 ml Aqua dest., davon 400 µl zu 20 ml der DAB-Lösung). Dieses Gemisch wurde mittels eines Nylonfilters gefiltert. Die hergestellte DAB-Lösung war ca. 20 Minuten haltbar, so dass die Färbung der Präparate rasch erfolgen musste. Nach Ablauf des TRIS-Puffers wurden die Schnitte um den Objektträger herum vorsichtig mit einem fusselfreien Tuch abgetrocknet Auch dieser Arbeitsschritt musste schnell erfolgen, damit die Präparate nicht komplett austrockneten. Nach Abtrocknen wurden die Objektträger 5 Minuten in die vorbereitete DAB-Lösung eingestellt. Nach einer 5-minütigen Inkubation in

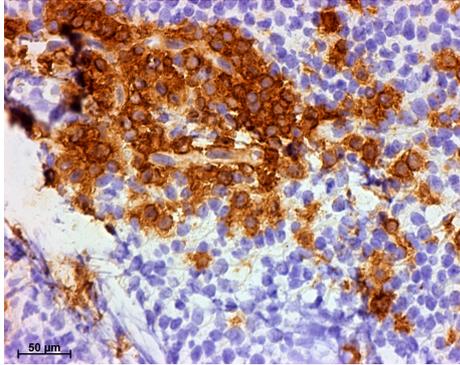
der DAB-Lösung wurden die Objektträger mit TRIS-Puffer gespült. Anschließend folgte die Einstellung für 5 Minuten in 300 ml Leitungswasser. Als nächstes wurde für 1 Minute mit Mayer's Hämalaun (Lösung 1: 4 verdünnt mit Aqua dest.) gefärbt. Dies bewirkte eine blass-blaue Färbung der Muskelfaserkerne, der Muskelfaserwände und des vorhandenen Bindegewebes. Nach dieser Färbung wurden die Objektträger in frischem Leitungswasser gespült und 5 Minuten darin eingestellt. Anschließend folgte eine Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Zunächst kurzes Schwenken in 70% Alkohollösung. Zweimal je mindestens 30 Sekunden in 96% Alkohollösung. Zweimal je mindestens 2 Minuten in 100% Alkohollösung. Als nächstes wurden die Objektträger in Xylol eingestellt. Darin verblieben sie bis zum Eindecken. Nach Abtrocknen des Objektträgers wurde ein Tropfen Roti Histokit II<sup>®</sup> auf den Schnitt gegeben und ein Deckglas darauf gelegt. Nach Trocknen des Objektträgers unter dem Abzug für mindestens 4 Stunden waren die Präparate bereit zum Begutachten. Wie vorher beschrieben, wurden zu jeder Färbereihe mit den Primärantikörpern CD20 und CD138 jeweils Färbungen mit 3 Positiv- und drei Negativkontrollen durchgeführt.



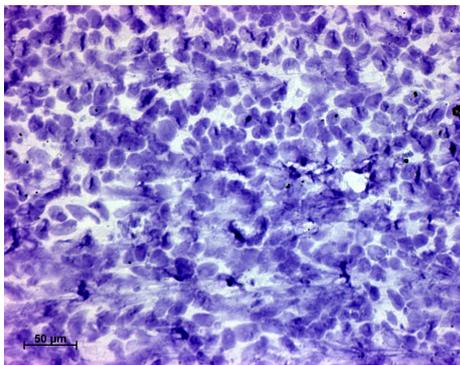
**Abb. 09a: Tonsille (Positivkontrolle)**, PAP-Färbung mit CD20-Antikörpern (braun), Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun (blau), 1:40 vergrößert.



**Abb. 09b: Tonsille (Negativkontrolle)**, PAP-Färbung mit IgG2a-Antikörpern (braun), Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun (blau), 1:40 vergrößert.



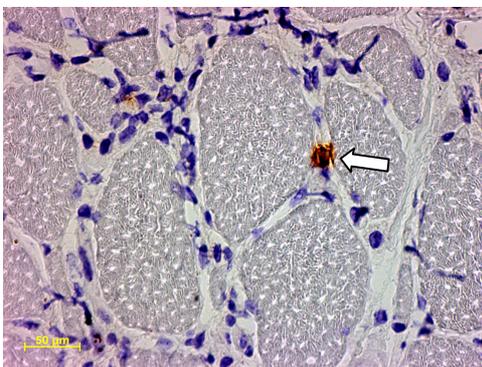
**Abb. 09c: Tonsille (Positivkontrolle)**, PAP-Färbung mit CD138-Antikörpern (braun), Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun (blau), 1:40 vergrößert.



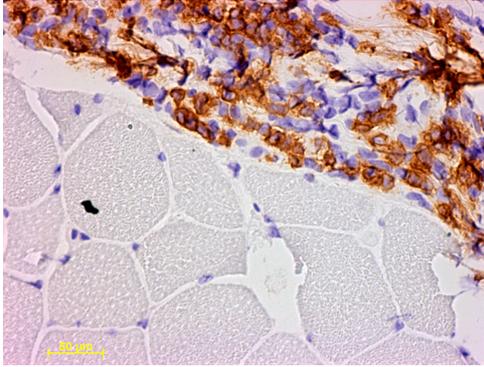
**Abb. 09d: Tonsille (Negativkontrolle)**, PAP-Färbung mit IgG1-Antikörpern (braun), Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun (blau), 1:40 vergrößert.

Hiermit wurde die spezifische Bindung der Primärantikörper CD20 und CD138 bestätigt. Unspezifische Bindungen von IgG1- und IgG2a-Antikörpern wurden nicht beobachtet. Eine unspezifische Hintergrundfärbung in den Negativkontrollen wurde ebenfalls nicht beobachtet. In den zur Kontrolle benutzten Muskelpräparaten von Patienten ohne Muskelerkrankung („gesunder Muskel“) konnten keinerlei B-Lymphozyten oder Plasmazellen gefunden werden.

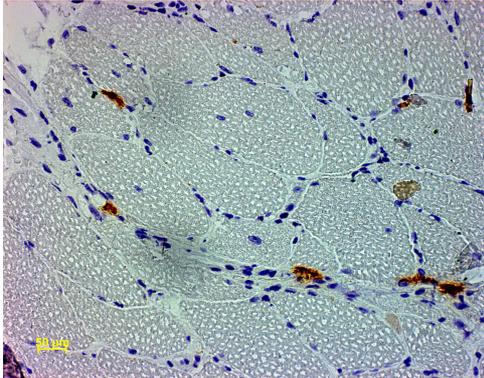
Es folgen einige ausgewählte Beispiele der DAB-Färbungen mit CD20- und CD138-Antikörpern bei PM, Jo-1-Syndrom, DM und IBM:



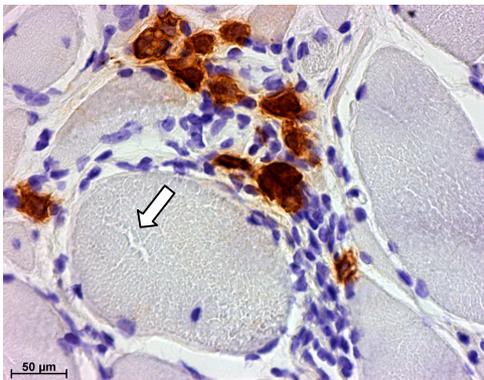
**Abb. 10a: Polymyositis**, PAP-Färbung mit CD20-Antikörpern (braun), 1:40 vergrößert. Endomysial ein B-Lymphozyt mit einem Ring aus braunem Farbstoff (Pfeil).



**Abb. 10b: Jo-1-Syndrom**, PAP-Färbung mit CD20-Antikörpern (braun), 1:40 vergrößert. Kompakte Ansammlung von perimysial gelegenen B-Lymphozyten.



**Abb. 10c: Dermatomyositis**, PAP-Färbung mit CD138-Antikörpern (braun), 1:20 vergrößert. Perimysial einige Plasmazellen.



**Abb. 10d: Einschlußkörpermyositis**, PAP-Färbung mit CD138-Antikörpern (braun), 1:40 vergrößert. Endomysial kompakte Ansammlung von Plasmazellen. Darunter eine Muskelfaser mit Spaltbildung, möglicherweise einer „Rimmed Vacuole“ entsprechend (Pfeil).

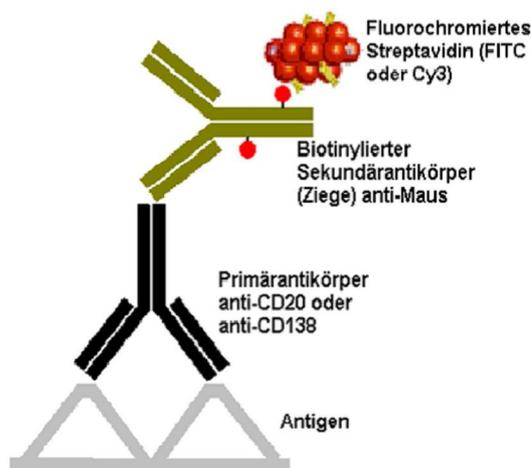
### Immunfluoreszenzfärbungen:

Immunfluoreszenzfärbungen wurden unter zwei Gesichtspunkten durchgeführt. Es sollte folgende Fragestellung überprüft werden: Färben CD20- und CD138-Antikörper tatsächlich unterschiedliche Immunzellen in der Tonsille und in den Muskelpräparaten von Patienten mit PM, Jo-1-Syndrom, DM oder IBM? Die Ergebnisse der PAP-Färbungen wurden somit kontrolliert. Da bei den PAP-Färbungen nur ein braunes Reaktionsprodukt zu sehen ist, kann man nicht eindeutig erkennen, ob tatsächlich unterschiedliche Zellen angefärbt werden. Nachteil der Immunfluoreszenzfärbung ist, dass man aufgrund der fehlenden

Gegenfärbung wichtige anatomische Strukturen im Muskel nicht eindeutig identifizieren kann, so dass zur Auswertung und Zählung der B-Lymphozyten und Plasmazellen die PAP-Färbung benutzt wurde. Vorteil der Immunfluoreszenzfärbung liegt darin, dass zwei verschiedene Antigene in ein und demselben Präparat unterschiedlich angefärbt und somit unterschieden werden können.

Bei der Immunfluoreszenzmethode werden bestimmte Epitope auf der Oberfläche von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. In dieser Arbeit wurde eine Drei-Schritt-Methode verwendet (6). Wie bei der PAP-Färbung wurden auch hier 2 µm dicke Schnitte benutzt. Bei -80°Celsius eingefrorene Schnitte wurden auf Zimmertemperatur gebracht. Es wurden Doppelfärbungen durchgeführt. Auf ein und demselben Präparat erfolgte die Inkubation mit CD20, welches mittels des Fluoreszenzfarbstoffs FITC sichtbar gemacht wurde, anschließend erfolgte eine nochmalige Inkubation mit CD138. Dieses wurde durch den Farbstoff Cy3 gefärbt. Mit FITC ist ein grün leuchtendes Reaktionsprodukt zu sehen, mit Cy3 ein rotes Reaktionsprodukt. Gefärbt wurden je ein Schnitt eines Muskelpräparates eines Patienten mit PM, Jo-1-Syndrom, DM und IBM sowie Positivkontrollen (Tonsille und „gesunder Muskel“, CD20 und CD138 als Primärantikörper) und Negativkontrollen (Tonsille und „gesunder Muskel“, IgG2a- und IgG1-Negativkontrollen als Primärantikörper). Die Präparate wurden kurz in PBS rehydriert, anschließend erfolgte nach Abtrocknen der Präparate eine Vorinkubation über 30 min mit 2% BSA in PBS (2g BSA in 100ml PBS) zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen. Eine Blockierung der endogenen Peroxidase ist bei dieser Färbemethode nicht notwendig, da die Fluoreszenzfarbstoffe nicht erst durch Zugabe von Wasserstoffperoxid aktiviert werden müssen. Nach Vorinkubation erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper CD20 über 30 min. Nach 10-minütigem Waschen mit PBS erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus IgG), der mit Biotin gekoppelt war. Nach nochmaligem Waschen über 10 Minuten in PBS erfolgte die Inkubation mit dem Tertiärantikörper FITC-Streptavidin, wiederum über 30 Minuten. Ab dieser Inkubation wurde aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe mit

abgedunkelten Spül- und Inkubationsbehältern gearbeitet. Nach nochmaligem Spülen über 10 Minuten mit PBS wiederholten sich Schritte eins bis drei, diesmal mit CD138 als Primärantikörper und Cy3-Streptavidin als Tertiärantikörper. Nach Abschluss der Färbereihe wurden die Präparate mit Kaiser's Glycerin-Gelatine eingedeckt und im Dunkeln bei 4<sup>0</sup> Celsius aufbewahrt bis zur Begutachtung. Die Begutachtung erfolgte spätestens einen Tag nach der Färbung. Mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbte Präparate verlieren allmählich ihre Leuchtkraft, so daß die Präparate nur ca. 2 Wochen begutachtet werden können, deswegen wurden stets Photographien von diesen Präparaten angefertigt.



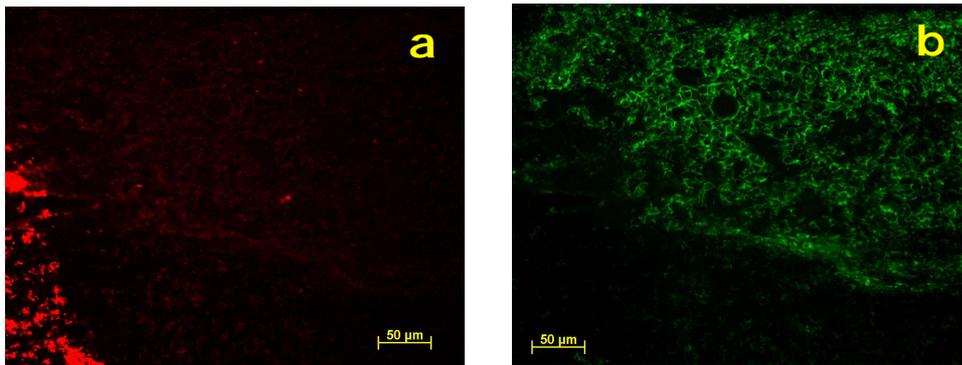
**Abb. 11:** Inkubation mit dem Primärantikörper, anschließend mit dem an Biotin gekoppelten Sekundärantikörper, schließlich mit Fluorochrom markiertem Streptavidin als Tertiärantikörper

**Tab. 06: Benutzte Antikörper, Konzentrationen und Verdünnungen für die Fluoreszenzfärbung**

Primärantikörper Zielantigen	IgG-Konzentration Primärantikörper	Primärantikörper Verdünnung	Sekundärantikörper	IgG-Konzentration Sekundärantikörper	Sekundärantikörper Verdünnung
CD20	450 µg/ml	1:10	Ziege-anti-Maus IgG	0,5mg/ml	1:50
CD138	90 µg/ml	1:50			
Negativkontrolle	IgG-Konzentration Negativkontrolle	Negativkontrolle Verdünnung	Tertiärantikörper	Konzentration Tertiärantikörper	Tertiärantikörper Verdünnung
IgG2a	200 µg/ml	1:22	FITC-Streptavidine	1mg/ml	1:50
IgG1	200 µg/ml	1:111	Cy3-Streptavidine	1mg/ml	1:500

Es wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Als Kontrollgewebe diente Tonsille und „gesunder Muskel“. Negativkontrollen wurden mit IgG2a

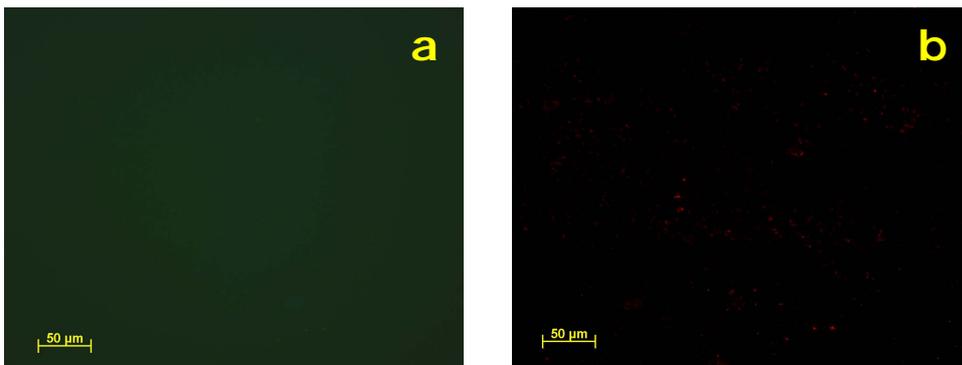
und IgG1 durchgeführt. Die folgenden Abbildungen zeigen CD20 und CD138 in der Tonsille:



**Abb. 12a und b: Tonsille (Positivkontrolle)**, 1:20 vergrößert. Fluoreszenzfärbung von CD20 mit FITC (grün) (a), Fluoreszenzfärbung von CD138 mit Cy3 (rot) (b).

CD20 und CD138 liegen eindeutig auf verschiedenen immunkompetenten Zellen, nämlich B-Lymphozyten und Plasmazellen, die in der Tonsille vorkommen.

Die folgenden Negativkontrollen (Färbungen mit IgG2a und IgG1 als Primärantikörper) dienen dazu, den Grad der unspezifischen Hintergrundfärbung und somit die Qualität der Färbungen festzustellen:

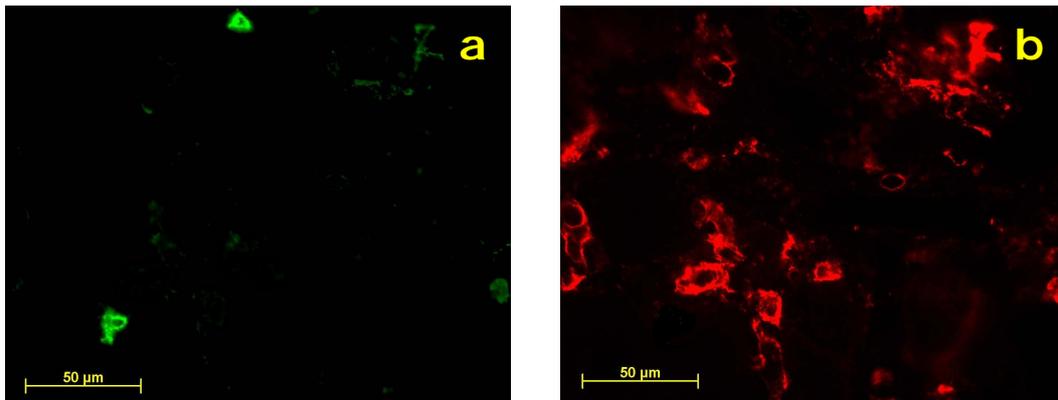


**Abb. 13a und b: Tonsille (Negativkontrolle)**, 1:20 vergrößert. Fluoreszenzfärbung von IgG2a mit FITC (a). Fluoreszenzfärbung von IgG1 mit Cy3 (b).

Erneut wurde derselbe Ausschnitt des Tonsillen-Präparates fotografiert. Hierbei erkennt man, dass die Hintergrundfärbung nur sehr schwach und deshalb zu vernachlässigen ist.

In den Muskelpräparaten von gesunden Kontrollen („gesunder Muskel“) waren keine CD20- oder CD138-positiven Immunzellen zu finden. Wie in der

Fluoreszenzfärbung der Tonsille kann man bei den Patienten mit PM, Jo-1-Syndrom, DM oder IBM CD20- und CD138-positive Zellen gut unterscheiden. Siehe folgende Beispiele:



**Abb. 14a und b: Polymyositis**, 1:40 vergrößert. Fluoreszenzfärbung von CD20 mit FITC (grün) (a), im gleichen Ausschnitt des Präparates Darstellung von CD138 mit Cy3 (rot) (b)

Somit wurde bestätigt, dass CD20- und CD138-Antikörper tatsächlich unterschiedliche Zellen anfärben.

#### **4.2.3. Methode der Auszählung der B-Lymphozyten und Plasmazellen**

Zur Analyse der B-Lymphozyten (BL) und Plasmazellen (PZ) wurde die PAP-Färbung benutzt. Aufgrund der PAP-Färbung, die immer zu einem braunen Reaktionsprodukt führt, konnte keine Doppelfärbung der Präparate durchgeführt werden. Wie von Arahata K und Engel AG beschrieben, wurden deswegen die Präparate in der Reihenfolge nummeriert und immer 2 angrenzende Präparate gefärbt, eines mit CD20-Antikörpern, das andere mit CD138-Antikörpern (4). Nach Arahata K und Engel AG sind in Schnitten, die 2 µm voneinander entfernt sind, mindestens 65% der mononukleären Zellen in beiden Schnitten identisch und die Präparate somit hinreichend vergleichbar.

Nach Arahata K und Engel AG (4) wurden die B-Lymphozyten und Plasmazellen in jeweils vier Stichproben von vier definierten Akkumulationszonen gezählt. Akkumulationszonen sind verschiedene

Bereiche innerhalb des Muskels, in denen entzündliche zelluläre Infiltrate bevorzugt liegen.

Perivaskulär:

Eine kompakte Ansammlung von Entzündungszellen um ein perimysiales Blutgefäß herum. Die gesamte Ansammlung wurde analysiert (Abb. 15a).

Perimysial:

Kompakte Ansammlung von Zellen im Perimysium über eine definierte Akkumulationszone einer von der Entzündung betroffenen perimysialen Region. Die gesamte Ansammlung wurde analysiert. Zum Perimysium werden auch bis zu zwei Schichten von an das Perimysium angrenzende Muskelfasern gezählt (Abb. 15b).

Endomysial kompakt:

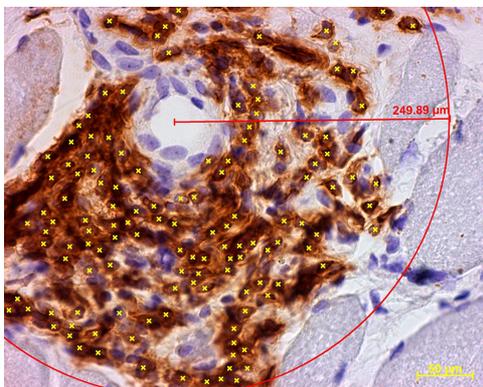
Eine kompakte Ansammlung von Entzündungszellen im Endomysium, die eine Muskelfaser umzingeln. Die gesamte Ansammlung wurde analysiert. Die Grenzen der Akkumulationszone wurden bestimmt von normal konfigurierten Muskelfasern und ohne dazwischen liegende Entzündungszellen, die an die von der Entzündung betroffene Akkumulationszone angrenzen (Abb. 15c).

Endomysial diffus:

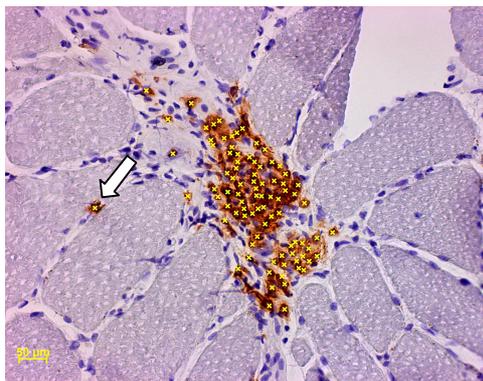
Einzelne Entzündungszellen oder kleine Gruppen bis zu maximal vier Entzündungszellen, die im Endomysium in einer von der Entzündung betroffenen Akkumulationszone zwischen zwei, drei oder vier Muskelfasern liegen. Die Grenzen der Akkumulationszone wurden bestimmt von normal konfigurierten Muskelfasern und ohne dazwischen liegende Entzündungszellen, die an die von der Entzündung betroffene Akkumulationszone angrenzen (Abb. 15d).

Durch diese Form der Einteilung konnten keine standardisierten, gleich großen Akkumulationszonen ausgewertet werden, da die Größe der von einer Entzündung betroffenen Region von der Heftigkeit der Entzündungsreaktion und der Menge an Entzündungszellen abhängt. Somit werden durch diese Zählweise keine Konzentrationsangaben von Zellen/mm<sup>2</sup> gewonnen, sondern eher eine Aussage über das Ausmaß der Entzündungsreaktion und über die Ausdehnung des entzündlichen Areals getroffen.

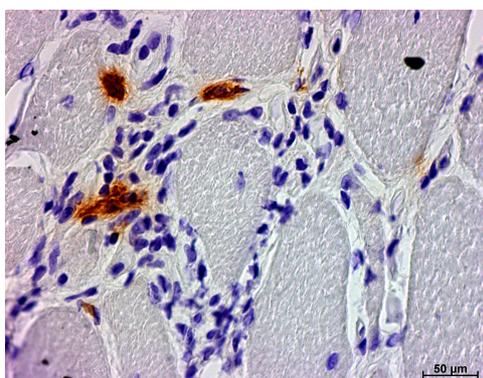
In den einzelnen Präparaten wurden stichprobenartig jeweils 4 perivaskuläre Akkumulationszonen, 4 perimysiale, 4 mit endomysial kompakter Ansammlung von B-Lymphozyten oder Plasmazellen und 4 mit endomysial diffus gelegenen B-Lymphozyten oder Plasmazellen bestimmt und die dort gelegenen B-Lymphozyten und Plasmazellen gezählt. Mit Hilfe einer auf dem Mikroskop montierten Kamera und der Bildanalysesoftware AxioVision® von Zeiss wurden Bilder von den Akkumulationszonen angefertigt. Durch den elektronischen Zoom des Bildanalyseprogramms konnten einzelne Zellen gut voneinander unterschieden werden. Gezählt wurden mononukleäre Zellen. Zellen wurden als positiv für das Vorhandensein des Oberflächenantigens CD20 oder CD138 gezählt, wenn die Zellen einen Ring aus braun gefärbtem Reaktionsprodukt aufwiesen. Zur Verdeutlichung der Zählweise und Auswahl der Akkumulationszonen folgende Beispiele:



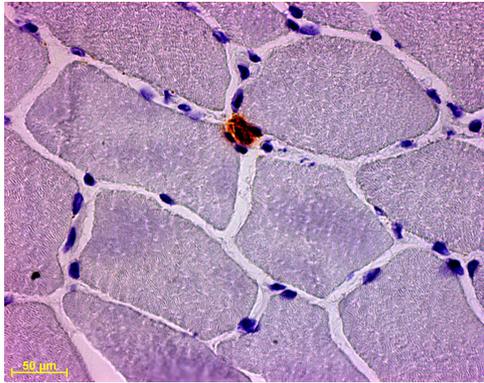
**Abb. 15a: Perivaskuläre Akkumulationszone:** IBM, 1:40 vergrößert. Ansammlung von vielen braun gefärbten CD20-positiven BL. Um ein perimysiales Gefäß wurde ein Kreis gezogen, der alle Entzündungszellen umfasste und alle in diesem Kreis gelegenen CD20-pos. Zellen gezählt (gelbe Zählkreuze).



**Abb. 15b: Perimysiale Akkumulationszone:** IBM, 1:40 vergrößert. Kompakte Ansammlung von CD20-pos. BL (gelbe Zählkreuze). Eine Zelle in der an das Perimysium angrenzenden Muskelfaserschicht wurde nach Protokoll dazu gezählt (Pfeil).



**Abb. 15c: Akkumulationszone „Endomysial kompakt“:** Polymyositis, 1:40 vergrößert. Kompakte Ansammlung von Entzündungszellen, darunter vier braun gefärbte CD138-positive Zellen (PZ). Alle hier abgebildeten PZ wurden zur selben endomysial kompakten Akkumulationszone gezählt.



**Abb. 15d: Akkumulationszone „Endomysial diffus“:** Polymyositis, 1:40 vergrößert. Eine braun gefärbte CD138-pos. PZ.

Ausgezählt wurden in mit CD20- oder CD138-Antikörpern gefärbten Präparaten immer die gleichen Akkumulationszonen. Innerhalb einer Akkumulationszone und über eine Distanz von 20 µm variiert nach Arahata K und Engel AG die Anzahl der Zellen nur um 10% (4). Anschließend wurde der Mittelwert berechnet und als gemittelte Zellzahl pro Akkumulationszone dargestellt.

**Tab. 07: Beispiel für eine Auszählung von vier perivaskulären Zonen. Dermatomyositis. CD20-gefärbtes Präparat.**

<b>Zone</b>	<b>CD20-positive Zellen</b>
1	1
2	2
3	2
4	1
<b>Summe</b>	<b>6</b>
<b>Mittelwert/Zone</b>	<b>1,5</b>

#### **4.2.4. Statistik**

Die gewonnen Mittelwerte (gemittelte Zellzahlen/Akkumulationszone), wie unter Punkt 4.2.3 und Tab. 07 beschrieben, wurden für jeden einzelnen Patienten getrennt nach B-Lymphozyten und Plasmazellen und getrennt nach Akkumulationszonen (perivaskulär, perimysial, endomysial kompakt und endomysial diffus) als Einzelwerte in Tabelle 09a-c (S. 47-49) aufgetragen. Zusätzlich wurden noch die Einzelwerte aller Akkumulationszonen addiert und als „Entzündungszellen gesamt“ dargestellt. Die Patienten wurden

nummeriert. Polymyositis: Patient 1 bis 7. Jo-1-Syndrom mit Myositis: Patienten 8 bis 11. Dermatomyositis: Patienten 12 bis 17. Einschlußkörpermyositis: Patienten 18 bis 23. Insgesamt wurden 23 Patienten untersucht. Statistische Ausreißer wurden für die statistische Analyse nicht berücksichtigt. Median, Mittelwert und Standardabweichung wurden berechnet. Aufgrund teilweiser Abweichung des Medians vom Mittelwert, des kleinen Stichprobenumfangs und Breite der Standardabweichung konnte nicht von einem normal verteilten Stichprobenumfang ausgegangen werden. Deswegen wurden statistische Tests mit nichtparametrischen Testverfahren durchgeführt. Mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde nach signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Akkumulationszonen gefahndet. Für den Kolmogorov-Smirnov-Test wurde das Signifikanzniveau aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs auf  $\alpha = 0,1$  festgelegt. Bei signifikanten Ergebnissen des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurden Einzelwertvergleiche zwischen PM, Jo-1-Syndrom, DM und IBM mittels des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

Für die Abb. 16 (S. 44) wurden die Einzelwerte von B-Lymphozyten und Plasmazellen addiert und von den Ergebnissen der Median berechnet. Die Mediane für jede Akkumulationszone und der Median aus der Summe der Einzelwerte aller Akkumulationszonen („gesamt“) wurden getrennt nach PM, Jo-1-Syndrom, DM und IBM als Säulendiagramm dargestellt. Statistische Tests wurden ebenfalls mittels Kolmogorov-Smirnov-Test, Mann-Whitney-U-Test und denselben Signifikanzniveaus durchgeführt.

Zur Frage nach den prozentualen Anteilen von B-Lymphozyten oder Plasmazellen in den Akkumulationszonen perivaskulär, perimysial und endomysial wurden die Einzelwerte von B-Lymphozyten und Plasmazellen addiert und von den Ergebnissen der prozentuale Anteil an Plasmazellen berechnet. Einzelwerte der Akkumulationszonen endomysial kompakt und diffus wurden dafür addiert (Abb. 17a-d, S. 51).

Beispiel:

Perimysiale Akkumulationszone. B-Lymphozyten: 2; Plasmazellen: 3; Summe: 5; Prozentualer Anteil an Plasmazellen von der Summe: 60%.

Die Prozentwerte wurden als Einzelwerte gesetzt und daraus Median, Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes berechnet und grafisch dargestellt. Statistische Tests wurden nur für die Mediane mittels Kolmogorov-Smirnov-Test, Mann-Whitney-U-Test und denselben Signifikanzniveaus, wie oben beschrieben durchgeführt. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm „Statistica für Windows, Version 5.1<sup>®</sup>“ durchgeführt.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1. Histologie**

Bei der PM und bei der IBM fand sich die stärkste Infiltration durch Entzündungszellen, gefolgt vom Jo-1-Syndrom und der DM. Bei PM, Jo-1-Syndrom, DM und IBM fand man eine nahezu ubiquitär vorkommende Muskelfasernekrose, wohingegen eine lokale perifaszikuläre Atrophie nur bei der DM, weniger beim Jo-1-Syndrom zu sehen ist. Weiterhin fand man bei der PM und IBM mehrfach Invasionen nicht-nekrotischer Muskelfasern, beim Jo-1-Syndrom und DM dagegen nur äußerst selten. Bei der PM und bei der IBM fanden sich die meisten CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in Verbindung mit einer ausgeprägten Überexpression von MHC-I auf der Oberfläche der Muskelfasern. Diese Kombination sah man weniger beim Jo-1-Syndrom und nahezu kaum bei der DM. Diese Beobachtungen stimmen mit denen anderer Studien überein (29, 39, 60). CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten kamen bei PM, Jo-1-Syndrom, DM und IBM vor, allerdings waren sie am stärksten vertreten bei der DM, gefolgt vom Jo-1-Syndrom. Makrophagen, (CD68<sup>+</sup>-Zellen) sah man ebenfalls bei PM, Jo-1-Syndrom, DM und IBM, jedoch am häufigsten bei der PM, gefolgt von der DM, seltener beim Jo-1-Syndrom oder der IBM. Die Färbung mit C5b9-Antikörpern wurde nur bei Patienten 13, 14, 16 und 17 durchgeführt, in einigen Muskelgefäßen dieser DM-Patienten wurden die C5b9-positiven Ablagerungen auch nachgewiesen. COX-negative Fasern kamen vermehrt bei der IBM vor.

**Tab. 08: Histologische Merkmale**

m = männlich; f = weiblich; M.vast.lat. = M. vastus lateralis; M.bic.brach. = M. biceps brachii; M.delt. = M. deltoideus; Infl. Infiltr.

Inflammatorisches Infiltrat; MF = Muskelfaser; - = nicht vorhanden; + = gering ausgeprägt; ++ = deutlich ausgeprägt; +++ = massiv ausgeprägt

Patient (m/f)	Biopsierter Muskel, Kraftgrad nach MRC	Infl. Infiltr. gesamt	MF-Nekrose	Invasion nicht-nekrotischer MF	MHC-I-Überexpression	CD8 <sup>+</sup> Zell-infiltrat	CD4 <sup>+</sup> Zell-infiltrat	CD68 <sup>+</sup> Zell-infiltrat	Perifaszikuläre Atrophie	C5b9-Gefäß-ablagerungen	COX-neg. Fasern vermehrt (j/n)
<b>Polymyositis</b>											
1 (m)	M.vast.lat., 3-4	+++	++	++	++	++	-	++			
2 (f)	M.bic.brach., 4	+	+	+	+	++	-	++			
3 (f)	M.vast.lat., 4	+++	++	++	+++	+++	+	+++			
4 (m)	M.bic.brach., 5-	+++	+++	+	+++	+	+	++			
5 (f)	M.bic.brach., 4	+	+	+	+	+	+	++			
6 (f)	M.vast.lat., 4-	+++	++	++	++	++	+	+++			
7 (f)	M.vast.lat., 4	++	+	+	+++	++	+	+			
<b>Jo-1-Syndrom</b>											
8 (f)	M.delt., 4+	+	+++	+	+	+	+	+	+++		
9 (m)	M.delt., 5	++	+	-	++	++	+	+	+		
10 (m)	M.bic.brach., 4	++	++	-	++	+	+	++	++		
11 (f)	M.bic.brach., 4+	+	++	-	+	+	+	+	++		
<b>Dermatomyositis</b>											
12 (f)	M.bic.brach., 4	++	+++	+	+	+	++	++	+++		
13 (f)	M.bic.brach., 4	+	+	-	+	+	++	++	++	+	
14 (f)	M.bic.brach., 3	++	+++	-	+	+	+	++	+++	+	
15 (f)	M.bic.brach., 4	+	+	-	+	+	+	++	++		
16 (f)	M.bic.brach., 3	+	+	-	-	-	+	+	++	-	
17 (m)	M.bic.brach., 5	++	++	-	-	-	+	+	+++	++	
<b>Einschlußkörpermyositis</b>											
18 (m)	M.bic.brach., 4+	+	+	+	+	++	+	+			nein
19 (m)	M.vast.lat., 4	+++	++	++	+++	++	-	+			nein
20 (f)	M.vast.lat., 4+	+++	++	++	++	++	+	+			ja
21 (f)	M.bic.brach., 4+	+	+	+	++	++	+	+			ja
22 (m)	M.bic.brach., 4	+++	++	++	+++	++	-	++			ja
23 (f)	M.bic.brach., 4+	++	++	++	+++	+	-	+			nein

## 5.2. B-Lymphozyten und Plasmazellen

Im Medianvergleich der Summe der B-Zelllinien-Zellen (B-Lymphozyten + Plasmazellen, BL + PZ) aller addierter Akkumulationszonen („gesamt“) waren bei der PM und IBM mehr B-Zelllinien-Zellen zu finden, als beim Jo-1-Syndrom oder DM. Diese Unterschiede waren signifikant ( $p < 0,05$ ). Beim Jo-1-Syndrom und bei DM waren ungefähr gleich viele B-Zelllinien-Zellen zu finden.

### Perivaskulär:

Bei der IBM waren im Medianvergleich mehr B-Zelllinien-Zellen zu finden als bei der PM, Jo-1-Syndrom oder DM. Diese Unterschiede waren signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei der PM, Jo-1-Syndrom und DM waren nahezu gleich viele B-Zelllinien-Zellen zu finden.

### Perimysial:

Bei der PM und IBM waren im Medianvergleich mehr B-Zelllinien-Zellen zu finden als beim Jo-1-Syndrom oder DM. Die wenigsten B-Zelllinien-Zellen waren beim Jo-1-Syndrom zu finden.

### Endomysial kompakt:

Die meisten B-Zelllinien-Zellen waren im Medianvergleich bei der PM zu finden, etwas weniger bei der IBM. Beim Jo-1-Syndrom und der DM waren keine B-Zelllinien-Zellen als kompakte Ansammlung endomysial zu finden.

### Endomysial diffus:

Der Medianvergleich ergab mehr B-Zelllinien-Zellen bei der PM und IBM als beim Jo-1-Syndrom oder DM. Diese Unterschiede waren signifikant ( $p < 0,05$ ). Beim Jo-1-Syndrom und DM waren gleich viele B-Zelllinien-Zellen zu finden.

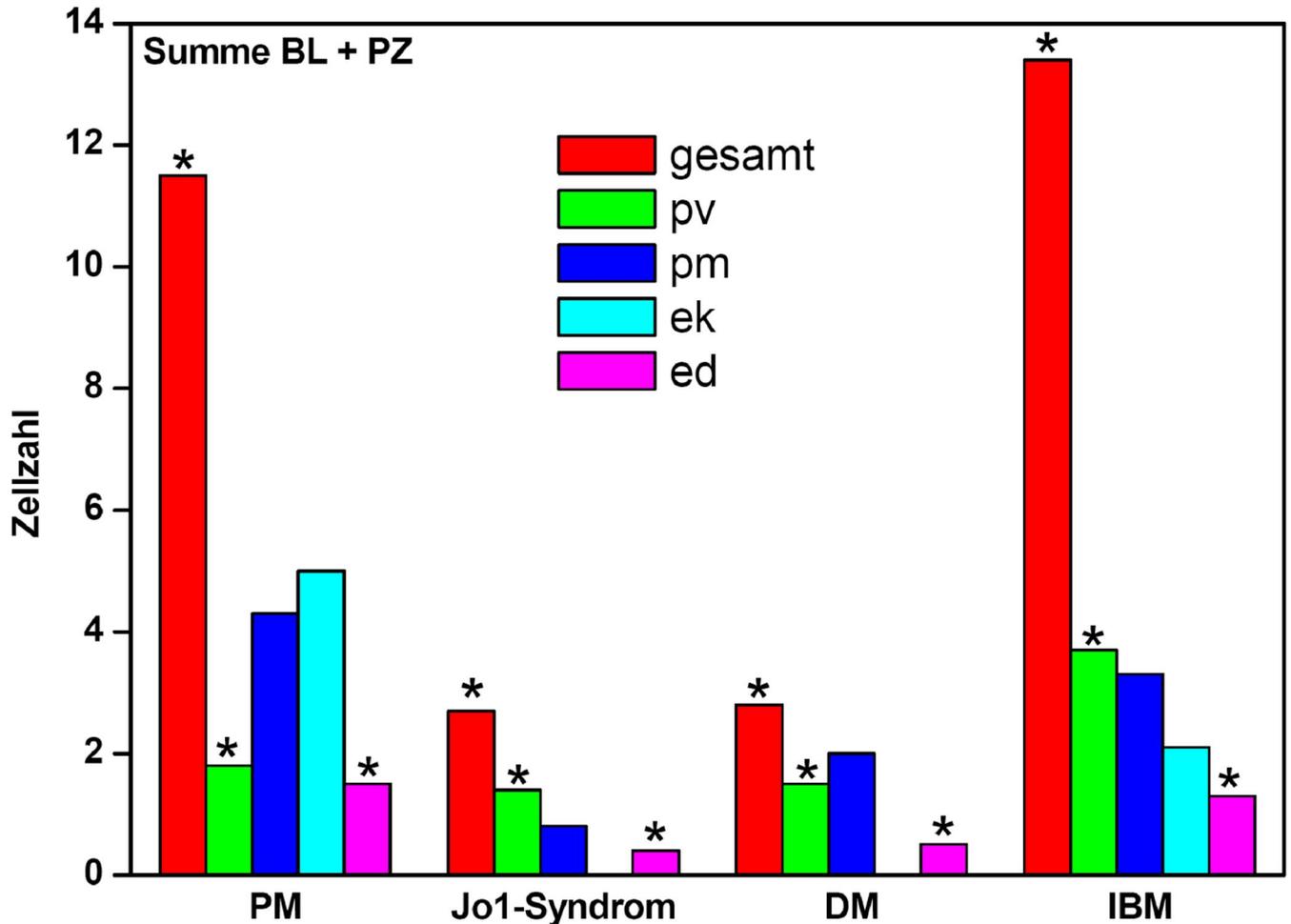


Abb. 16: B-Lymphozyten und Plasmazellen bei PM, Jo-1-Syndrom, DM, IBM. Die Höhe der Säulen geben die Mediane der Summe aus B-Lymphozyten (BL) und Plasmazellen (PZ) an. pv = perivaskulär. pm = perimysial. ek = endomysial kompakt. ed = endomysial diffus. \* = Signifikanter Unterschied beim Vergleich der Mediane ( $p < 0,05$ )

Im Medianvergleich der Einzelwerte (BL und PZ getrennt) aller Akkumulationszonen („Entzündungszellen gesamt (perivaskulär, perimysial, endomysial kompakt und endomysial diffus)“) fanden sich bei der PM ca. 16-mal mehr B-Lymphozyten als beim Jo-1-Syndrom, ca. 4-mal mehr als bei der DM. Bei der IBM fanden sich ca. doppelt so viele B-Lymphozyten als bei der PM, 22-mal mehr als beim Jo-1-Syndrom, und 2,75-mal mehr als bei der DM. Beim Vergleich der Plasmazellen fanden sich ca. 4-mal mehr Plasmazellen bei der PM als beim Jo-1-Syndrom, ca. 20-mal mehr als bei der DM und ca. 2-mal mehr als bei der IBM. Insgesamt fanden sich mehr B-Lymphozyten und mehr Plasmazellen bei der PM und IBM als beim Jo-1-Syndrom und der DM. Bei PM, Jo-1-Syndrom und IBM waren mehr Plasmazellen als B-Lymphozyten

zu finden, bei der DM waren 4-mal mehr B-Lymphozyten als Plasmazellen zu finden (Tab. 09).

#### Perivaskulär:

Beim Medianvergleich der Einzelwerte fanden sich bei der IBM 4-mal mehr B-Lymphozyten als bei der PM, 20-mal mehr als beim Jo-1-Syndrom. Diese Unterschiede waren signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei der IBM fanden sich doppelt so viele B-Lymphozyten als bei der DM. Dies war nicht signifikant. Bei PM, Jo-1-Syndrom und IBM fanden sich nahezu gleich viele Plasmazellen. Bei der DM waren keine Plasmazellen zu finden. Bei der DM und bei der IBM fanden sich mehr B-Lymphozyten als Plasmazellen, bei der PM und beim Jo-1-Syndrom mehr Plasmazellen als B-Lymphozyten (Tab. 09).

#### Perimysial:

Bei der DM fanden sich bei Vergleich der Einzelwertmediane 10-mal mehr B-Lymphozyten als beim Jo-1-Syndrom. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Bei der PM und IBM waren keine B-Lymphozyten zu finden. Bei der PM waren ca. 6-mal mehr Plasmazellen zu finden als beim Jo-1-Syndrom, 13-mal mehr als bei der DM und ca. doppelt so viele als bei der IBM. Bei der IBM waren 4-mal mehr Plasmazellen zu finden als beim Jo-1-Syndrom und ca. 8-mal mehr als bei der DM. Die meisten B-Lymphozyten fanden sich bei der DM. Bei der PM und der IBM waren mehr Plasmazellen zu finden als beim Jo-1-Syndrom oder der DM (Tab. 09).

#### Endomysial kompakt:

Bei Vergleich der Einzelwertmediane fanden sich nur bei der PM B-Lymphozyten als endomysial kompakte Ansammlungen. Dies war signifikant im Vergleich zum Jo-1-Syndrom und der DM ( $p < 0,05$ ). Bei der PM fanden sich doppelt so viele Plasmazellen als bei der IBM. Dieser Unterschied war ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ ). Beim Jo-1-Syndrom und der DM fanden sich keine Plasmazellen. Zusammenfassend fanden sich nur bei der PM B-Lymphozyten und Plasmazellen als kompakte endomysiale Ansammlungen, bei der IBM nur Plasmazellen. Beim Jo-1-Syndrom und bei der DM fanden sich weder B-Lymphozyten noch Plasmazellen als kompakte Ansammlungen (Tab. 09).

Endomysial diffus:

B-Lymphozyten waren weder bei PM, Jo-1-Syndrom, DM oder IBM zu finden. Bei der PM fanden sich ca. 3-mal mehr Plasmazellen als beim Jo-1-Syndrom. Dies war signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei der DM waren keine Plasmazellen zu finden. Dies war im Vergleich zur PM ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei der PM waren doppelt so viele Plasmazellen zu finden als bei der IBM. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant. Bei der DM fanden sich endomysial diffus weder B-Lymphozyten noch Plasmazellen. Bei der PM, Jo-1-Syndrom und IBM fanden sich nur Plasmazellen (Tab. 09).

**Tab. 09: Mittlere Zellzahl/ Akkumulationszone**

BL = B-Lymphozyten. PZ = Plasmazellen. MW +/- SD = Mittelwert +/- Standardabweichung. Ausreißer sind **rot** gekennzeichnet. <sup>1</sup> = Berechnung von Median und MW +/- SD OHNE Ausreißer. Signifikant unterschiedliche Mediane sind **blau** gekennzeichnet (p < 0,05).

Polymyositis (n = 7)			Jo-1-Syndrom (n = 4)			Dermatomomyositis (n = 6)			Einschlußkörpermyositis (n = 6)		
<b>Entzündungszellen gesamt (Perivaskulär, perimysial, endomysial kompakt und endomysial diffus)</b>											
<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>
1	10,5	20,5	8	0,75	6,25	12	3	8,75	18	2	5,25
2	3,5	7,5	9	<b>161,5</b>	3	13	1	0,25	19	9	2,25
3	<b>518</b>	52	10	0,25	1	14	<b>266</b>	19,5	20	1	14,58
4	1,5	2,25	11	0,25	2,42	15	2	0,75	21	18	6,17
5	4	2				16	0	0,25	22	7	12,75
6	7,25	9,83				17	5	0	23	4	2,5
7	1	10,95									
<i>Median</i> <sup>1</sup>	3,8	9,8		0,25	2,71		2	0,5		5,5	5,7
<i>MW+/-SD</i> <sup>1</sup>	4,6+/-3,3	15+/-16,2		0,4+/-0,2	3,2+/-1,9		2,2+/-1,7	4,9+/-7,2		6,8+/-5,7	7,3+/-4,8
<b>Perivaskulär</b>											
<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>
1	0,5	2,5	8	0,75	1,75	12	2	1,25	18	2	1
2	0,5	1	9	0	1,25	13	1	0	19	2	0,75
3	<b>232</b>	3,5	10	0	0,25	14	<b>264</b>	4,75	20	1	3,33
4	0,5	0,5	11	0,25	1,25	15	0	0	21	17	0,75
5	2	0,5				16	0	0	22	2	5,25
6	0,25	0,75				17	2	0	23	2	1
7	1	1									
<i>Median</i> <sup>1</sup>	<b>0,5*</b>	1		<b>0,1*</b>	1,3		1	0		<b>2*</b>	1
<i>MW+/-SD</i> <sup>1</sup>	0,8+/-0,6	1,4+/-1,1		0,3+/-0,3	1,1+/-0,5		1+/-0,9	1+/-0,7		1,8+/-0,4	2+/-1,9

Tab. 09, Fortsetzung 1:

Polymyositis (n = 7)			Jo-1-Syndrom (n = 4)			Dermatomomyositis (n = 6)			Einschlußkörpermyositis (n = 6)		
<b>Perimysial</b>											
<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>
1	5	8	8	0	0,5	12	1	7	18	0	3
2	0	3,5	9	1,5	1,5	13	0	0,25	19	4	0
3	10	20	10	0,25	0,75	14	2	12,25	20	0	2,5
4	0	0	11	0	0,67	15	2	0	21	0	3,67
5	1	0,25				16	0	0,25	22	0	5
6	0	4,33				17	2	0	23	0	0,75
7	0	5,7									
<i>Median</i> <sup>1</sup>	0	3,9		0,1	0,7		1	0,3		0	2,5
<i>MW</i> +/- <i>SD</i> <sup>1</sup>	2,3+/-3,9	6+/-6,8		0,4+/-0,6	0,9+/-0,4		1+/-1	3,3+/-5,2		0,7+/-1,6	2,5+/-1,9
<b>Endomysial kompakt</b>											
<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>
1	4	6,75	8	0	3,5	12	0	0	18	0	0,5
2	3	2	9	160	0	13	0	0	19	2	0,5
3	264	16,5	10	0	0	14	0	2	20	0	6
4	1	1,25	11	0	0	15	0	0,25	21	0	1,25
5	1	0,25				16	0	0	22	5	2,25
6	6	3,75				17	0	0	23	1	0,75
7	0	1									
<i>Median</i> <sup>1</sup>	1*	1,6*		0*	0		0*	0*		0	0,8*
<i>MW</i> +/- <i>SD</i> <sup>1</sup>	2,5+/-2,3	4,5+/-5,7		0+/-0	0,9+/-1,8		0+/-0	0,4+/-0,8		1,3+/-2	1,9+/-2,1

Tab. 09, Fortsetzung 2:

Polymyositis (n = 7)			Jo-1-Syndrom (n = 4)			Dermatomomyositis (n = 6)			Einschlußkörpermyositis (n = 6)		
<b>Endomysial diffus</b>											
<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>	<i>Patient</i>	<i>BL</i>	<i>PZ</i>
1	1	3,25	8	0	0,5	12	0	0,5	18	0	0,75
2	0	1	9	0	0,25	13	0	0	19	1	1
3	4	4	10	0	0	14	0	0,5	20	0	2,75
4	0	0,5	11	0	0,5	15	0	0,5	21	1	0,5
5	0	1				16	0	0	22	0	0,25
6	1	1				17	1	0	23	1	0
7	0	3,25									
<i>Median</i> <sup>1</sup>	0	1*	0	0	0,4*	0	0	0*	0	0	0,5
<i>MW</i> +/- <i>SD</i> <sup>1</sup>	0,9+/-1,5	2+/-1,4	0+/-0	0,3+/-0,2		0,2+/-0,4	0,3+/-0,3		0,5+/-0,5	0,9+/-1	

Betrachtet man die Mediane des prozentualen Anteils von Plasmazellen (PZ) oder B-Lymphozyten (BL) bei der *Polymyositis*, fanden sich perivaskulär ungefähr gleich viele BL und PZ. Perimysial waren mehr PZ als BL. Der Anteil an PZ fiel endomysial wieder leicht ab, dennoch waren immer noch mehr PZ als BL zu finden. Der Mittelwert (MW) zeigte endomysial einen ungefähr gleich großen Anteil von PZ (Abb. 17a).

#### Jo-1-Syndrom

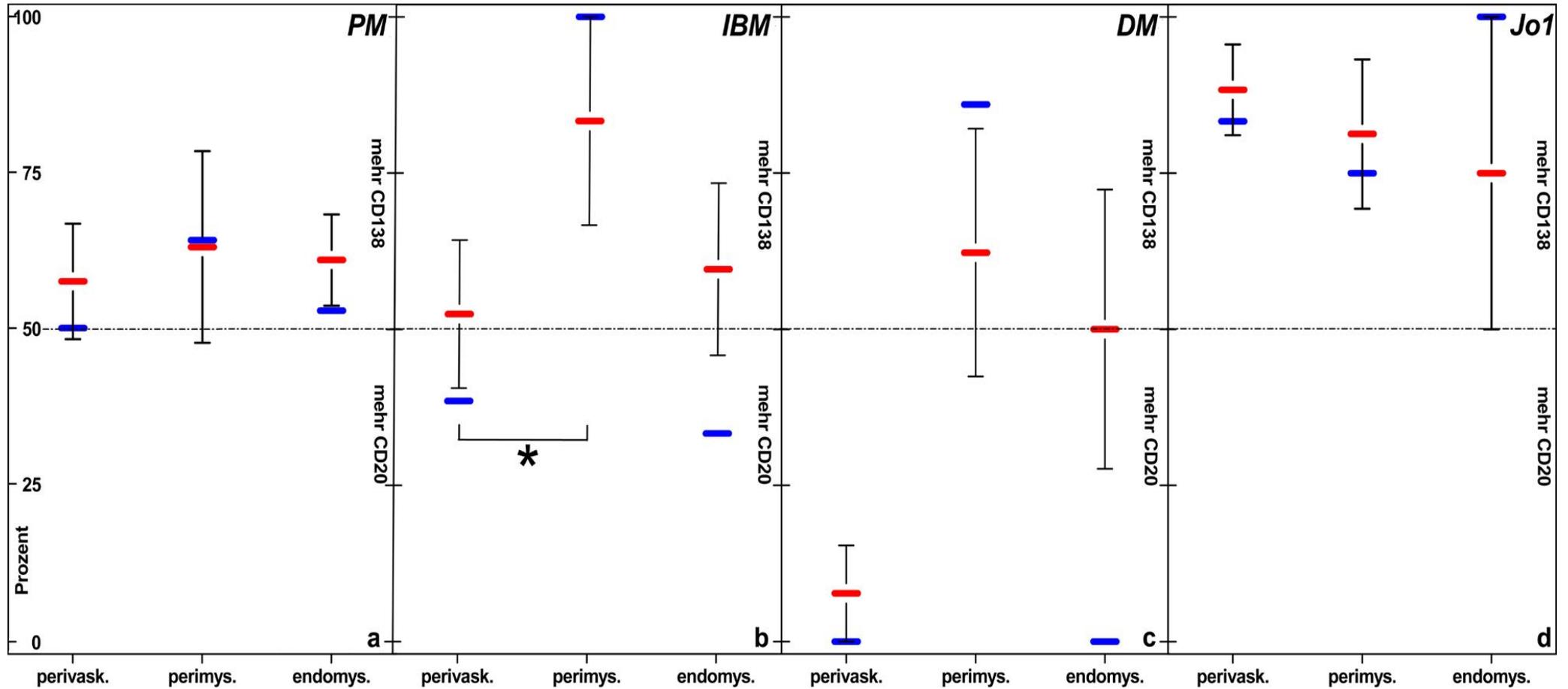
Beim Medianvergleich des prozentualen Anteils von PZ oder BL fand sich bereits perivaskulär ein hoher Prozentsatz an PZ, der perimysial wieder leicht abfiel. Endomysial fanden sich nur PZ, keine BL. Der MW endomysial zeigte aber einen ca. 25% geringeren Anteil an PZ als der Median (Abb. 17b).

#### Dermatomyositis:

Perivaskulär fanden sich beim Vergleich der Mediane des prozentualen Anteils von PZ oder BL nur BL. Perimysial fanden sich mehr PZ als BL. Endomysial fanden sich wieder nur BL. Bei Betrachtung der Mittelwerte entsprach der MW perivaskulär in etwa dem Median. Perimysial waren mehr PZ als BL zu finden. Endomysial war der Prozentsatz an Plasmazellen rückläufig, es waren ungefähr gleich viel BL und PZ zu finden (Abb. 17c).

#### Einschlußkörpermyositis:

Beim Vergleich der Mediane des prozentualen Anteils von PZ oder BL fanden sich perivaskulär und endomysial mehr BL als PZ. Perimysial fanden sich prozentual mehr PZ an der Summe aus BL und PZ. Der Medianvergleich zwischen perivaskulärer und perimysialer Akkumulationszone war signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Mittelwerte zeigten perivaskulär einen nur leicht überwiegenden Anteil von PZ. Perimysial war der Anteil von PZ größer als perivaskulär. Endomysial war der Anteil an PZ wieder rückläufig, aber noch größer als perivaskulär (Abb. 17d).



**Abb. 17a-d: Prozentualer Anteil von Plasmazellen (CD138) an der Summe aus B-Lymphozyten (CD20) und Plasmazellen in den verschiedenen Akkumulationszonen. Median = blauer Balken. Mittelwert = roter Balken. Standardfehler (SEM) = senkrechte Balken.**

## 6. Diskussion

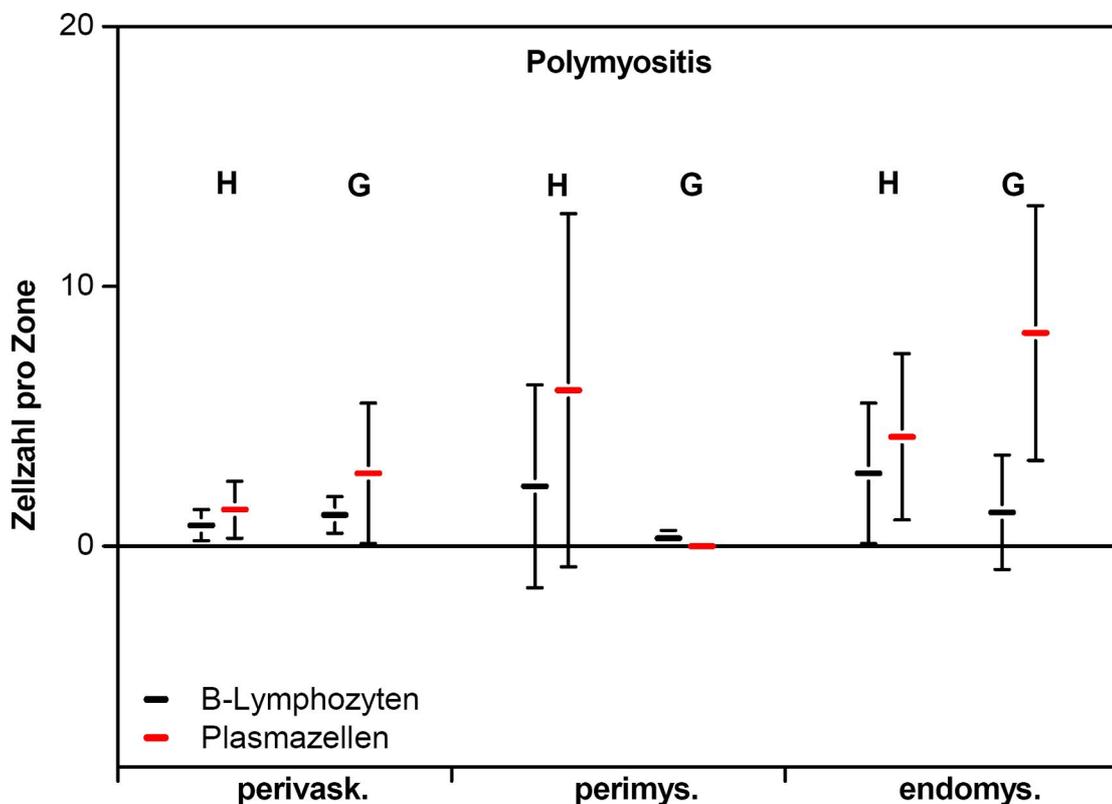
### 6.1. B-Lymphozyten und Plasmazellen bei PM, DM, IBM

Bei Greenberg SA et al. (31) als auch in der vorliegenden Arbeit wurden zur Identifikation von B-Lymphozyten Antikörper gegen CD20, zur Identifikation von Plasmazellen Antikörper gegen CD138 verwendet. Zusätzlich erfolgte bei beiden Untersuchungen eine Einteilung in Akkumulationszonen, wie von Arahata K und Engel AG beschrieben (4, 31, 32). Allerdings wurde von Greenberg SA et al. (31) nicht zwischen endomysial diffus und endomysial kompakt unterschieden. Zur Vergleichbarkeit wurden deswegen in der vorliegenden Arbeit die Zellen der B-Zelllinie in den Akkumulationszonen endomysial kompakt und endomysial diffus addiert und als endomysial präsentiert. Greenberg SA et al. (31) präsentierten in ihrer quantitativen Untersuchung von B-Lymphozyten und Plasmazellen bei Dermatomyositis, Einschlußkörpermyositis und Polymyositis Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung pro mm<sup>2</sup>.

Es wurden dabei jeweils alle B-Lymphozyten und Plasmazellen im Muskelbiopsat gezählt. Das Jo-1-Syndrom wurde nicht berücksichtigt. Ein Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der Ergebnisse von Greenberg SA et al. (31) ist trotz geringer Unterschiede in der Zählweise nur bedingt möglich, da Greenberg SA et al. (31) nur Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angeben, was bei den geringen Fallzahlen problematisch ist. Bei der Polymyositis wurden B-Lymphozyten und Plasmazellen sogar nur bei einem Patienten gezählt und das Ergebnis als Mittelwert angegeben. In der vorliegenden Arbeit gingen statistische Ausreißer nicht in die Mittelwertberechnung mit ein, bei Greenberg SA et al. wurden aber wohl aufgrund großer Standardabweichungen die statistischen Ausreißer mit berücksichtigt (31). Zu Ausreißern kommt es vermutlich aufgrund unterschiedlich langen Krankheitsverlaufs sowie vermuteter individueller Unterschiede in der Ausprägung der Immunreaktion. Auch die Dauer des Krankheitsverlaufs spielt hierfür eine Rolle. Auf die Dauer vom Beginn der klinischen Symptome bis zum Zeitpunkt der Muskelbiopsie gehen Greenberg SA et al. (31) aber nicht ein. Der Vergleich mit den Ergebnissen

der Arbeit von Arahata K und Engel AG (4) wurde nicht durchgeführt, da dort nur B-Lymphozyten gefärbt und gezählt wurden.

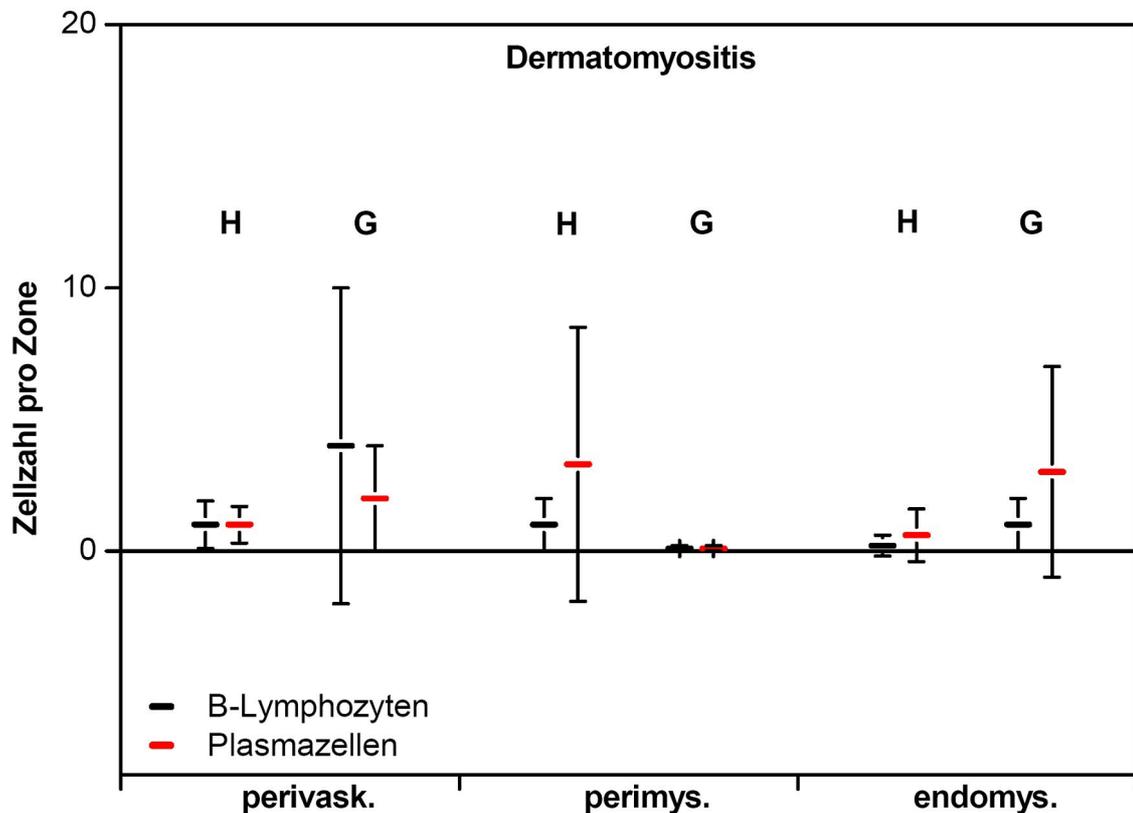
Polymyositis: Perivaskulär und endomysial fanden sich bei beiden Arbeiten immer mehr Plasmazellen als B-Lymphozyten. Endomysial wurden mehr B-Zelllinien-Zellen als perivaskulär gefunden. Greenberg SA et al. (31) fanden aber perimysial kaum B-Lymphozyten und Plasmazellen, wo hingegen in der hier vorliegenden Arbeit mehr Plasmazellen als B-Lymphozyten und insgesamt gesehen mehr Zellen der B-Zelllinie als perivaskulär und weniger als endomysial gefunden wurden. Greenberg SA et al. (31) fanden auch weniger B-Lymphozyten endomysial als in der vorliegenden Arbeit, so dass die Kluft zwischen Plasmazellen und B-Lymphozyten dramatischer erscheint.



**Abb. 18a: Mittelwerte von B-Lymphozyten und Plasmazellen.** Daten der vorliegenden Arbeit (H) und der von Greenberg SA et al. (31) (G) zur Polymyositis für die Akkumulationszonen perivaskulär (perivask.), perimysial (perimys.) und endomysial (endomys.). Waagrechte Balken kennzeichnen Mittelwerte, senkrechte Balken die Standardabweichung. PM-Fälle bei (H): n = 7. PM-Fälle bei (G): n = 1.

### *Dermatomyositis:*

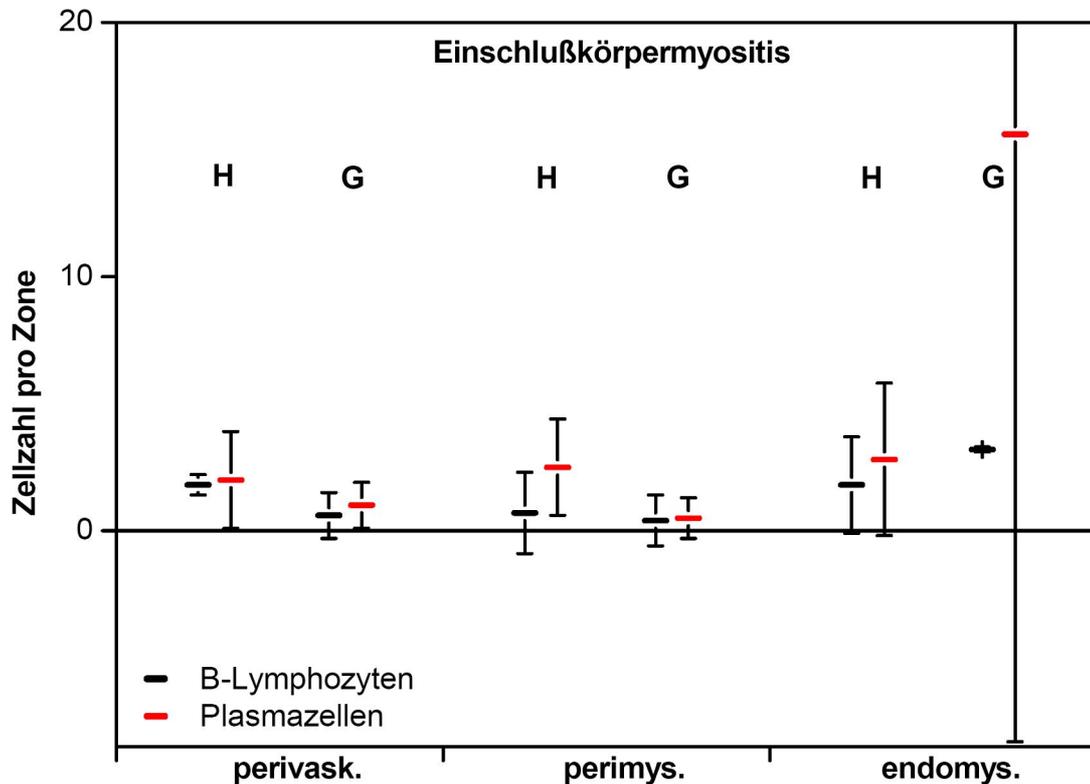
Perivaskulär fanden Greenberg SA et al. (31) mehr B-Lymphozyten als Plasmazellen, wohingegen in der vorliegenden Arbeit nahezu gleiche Werte für B-Lymphozyten und Plasmazellen gefunden wurden. Die Standardabweichung für die B-Lymphozyten war aber bei Greenberg SA et al. (31) sehr breit, so dass vermutet werden kann, dass ein statistischer Ausreißer in die Berechnung mit einging. Perimysial wurden bei Greenberg SA et al. (31) nahezu keine Entzündungszellen der B-Zelllinie gefunden. Dies korrelierte nicht mit den Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit, wie auch mit den Ergebnissen von Arahata K und Engel AG (4) zur Analyse von B-Lymphozyten in der perimysialen Akkumulationszone. Für Dalakas MC und Hohlfeld R (14, 16) sind nach Auswertung verschiedener Studien perivaskuläre, aber auch perimysiale Infiltrate bei der DM diagnostisches Kriterium. In der vorliegenden Arbeit wurden perivaskulär und perimysial nahezu gleich viele B-Lymphozyten gefunden, aber perimysial eine größere Zahl an Plasmazellen, so dass die ausgeprägteste Entzündungsreaktion perimysial zu finden war. Endomysial fanden Greenberg SA et al. (31) mehr Plasmazellen als perivaskulär. Im Vergleich mit den Daten der vorliegenden Arbeit fanden Greenberg SA et al. (31) mehr B-Zelllinien-Zellen endomysial. Diese Beobachtung von Greenberg SA et al. (31) korreliert nicht mit den Beobachtungen verschiedener Autoren, dass Entzündungszellen bei der DM überwiegend perivaskulär und perimysial gefunden werden (14, 16, 27).



**Abb. 18b: Mittelwerte von B-Lymphozyten und Plasmazellen.** Daten der vorliegenden Arbeit (H) und der von Greenberg SA et al. (31) (G) zur Dermatomyositis für die Akkumulationszonen perivaskulär (perivask.), perimysial (perimys.) und endomysial (endomys.). Waagrechte Balken kennzeichnen Mittelwerte, senkrechte Balken die Standardabweichung. DM-Fälle bei (H): n = 6. DM-Fälle bei (G): n = 5.

Einschlußkörpermyositis:

Greenberg SA et al. (31) fanden perivaskulär und perimysial kaum B-Lymphozyten und Plasmazellen. In der vorliegenden Arbeit wurden mehr Entzündungszellen der B-Zellenlinie perivaskulär gefunden. Perimysial fanden sich in der vorliegenden Arbeit weniger B-Lymphozyten, aber mehr Plasmazellen. Endomysial, wo bei der IBM die stärkste Entzündung abläuft, fanden sich in beiden Arbeiten mehr Plasmazellen als B-Lymphozyten. Bei Greenberg SA et al. (31) ist dieser Wert aber extrem hoch, die Standardabweichung sehr breit, was wiederum zu der Vermutung führt, dass ein statistischer Ausreißer berücksichtigt wurde.



**Abb. 18c: Mittelwerte von B-Lymphozyten und Plasmazellen.** Daten der vorliegenden Arbeit (H) und der von Greenberg SA et al. (31) (G) zur Einschlußkörpermyositis für die Akkumulationszonen perivaskulär (perivask.), perimysial (perimys.) und endomysial (endomys.). Waagrechte Balken kennzeichnen Mittelwerte, senkrechte Balken die Standardabweichung. IBM-Fälle bei (H): n = 6. IBM-Fälle bei (G): n = 5.

### 6.3. Pathogenetische Überlegungen

Nach den bisherigen Theorien zur Pathogenese besteht bei PM und IBM eine überwiegend zelluläre Immunantwort, da man in den Muskelbiopsaten von Patienten mit PM und IBM kaum B-Lymphozyten gefunden hat.

Demgegenüber geht man bei der DM von einer überwiegend humoralen Immunantwort aus. Das Jo-1-Syndrom wurde bisher aufgrund seines histopathologischen und klinischen Erscheinungsbildes entweder zur PM oder zur DM gerechnet.

### **6.3.1. Rolle der B-Lymphozyten und Plasmazellen bei der Entstehung der idiopathischen inflammatorischen Myopathien**

Zur Entstehung einer Autoimmunerkrankung tragen B-Lymphozyten genauso wie auch T-Lymphozyten bei (1). B-Lymphozyten haben ebenfalls einen membranständigen spezifischen Rezeptor, mittels dem Antigene präsentiert werden können (48). Die Spezifität erhält der B-Zell-Rezeptor im Reifungsstadium durch Genarrangement. Eine Rolle beim Überleben potentiell autoaggressiver B-Lymphozyten spielt auch „BAFF“, ein B-Zellen-Aktivierungsfaktor aus der Tumornekrosefaktor-Familie (19, 53). Nach Kontakt mit einem dem B-Zell-Rezeptor entsprechenden Autoantigen kommt es zur Aktivierung, klonalen Expansion und anschließend zur Antikörperausschüttung (27). Zur Aktivierung benötigen B-Zellen die Hilfe anderer immunkompetenter Zellen, wie T-Zellen oder dendritischer Zellen (1). Durch Verarbeitung des Autoantigens und anschließender Präsentation neuer Peptidfragmente tragen B-Lymphozyten auch zum „Epitope-Spreading“ bei (51). Nach Aktivierung von B-Lymphozyten kommt es zu einer Immunkaskade: B-Zellen exprimieren ein Antigen, exprimieren ko-stimulatorische Moleküle, wie Zytokine, wodurch T-Lymphozyten angelockt werden. T-Lymphozyten werden dadurch ebenfalls aktiviert, schütten ihrerseits ko-stimulatorische Moleküle aus und aktivieren dadurch weitere B-Lymphozyten. Aktivierte B-Lymphozyten verarbeiten das Zielantigen und exprimieren neue Antigene (19, 21). Dadurch wird unklar, welches Antigen die Immunkaskade auslöst und welche Immunzellen als erste zur Entstehung der Autoimmunerkrankung beitragen.

Obgleich es sinnvoll ist, strikt zwischen humoralen und zellulären Immunphänomenen zu trennen, können sich aber bei Autoimmunerkrankungen beide Arme überschneiden (21). Dieses Überschneiden wurde erstmals für die Myasthenia gravis nachgewiesen. Antikörper und T-Zellen sind gegen das gleiche Antigen gerichtet, eine Peptideinheit auf dem Acetylcholinrezeptor (37). 1997 zeigten Dalakas MC et al. eine monoklonale Gammopathie im Serum eines Teils von Patienten mit

IBM als möglicher Hinweis auf eine chronische B-Zell-Aktivierung (12). Ein weiterer Hinweis auf die Verknüpfung beider Arme der Immunreaktion liefert eine Beobachtung bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses. Nach Gabe von Rituximab, kam es neben einer B-Zell-Depletion auch zu einer Abnahme von aktivierten T-Lymphozyten (73). Basierend auf den Ergebnissen von Greenberg SA et al. (31) wurde gezeigt, dass es bei B-Lymphozyten und Plasmazellen von Patienten mit PM, DM und IBM zu einer oligoklonalen Expansion kommt. Zusätzlich konnte eine Änderung der Antikörperklasse von IgM zu IgA oder IgG festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine antigenspezifische Aktivierung des humoralen Immunsystems stattgefunden hat (8).

### **6.3.2. Polymyositis, Dermatomyositis, Einschlußkörpermyositis**

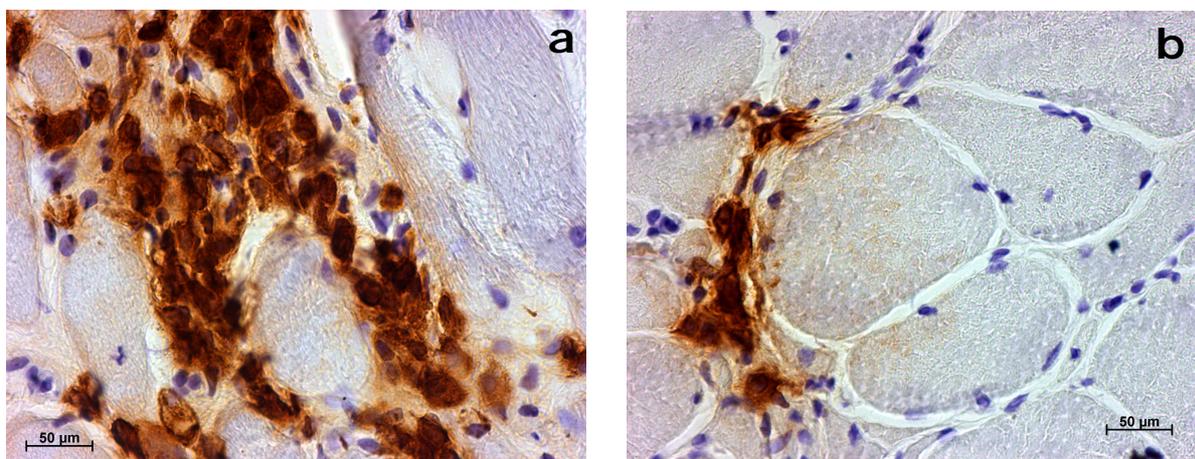
Die humorale Immunantwort spielt bei der PM und bei der IBM eine größere Rolle als bisher angenommen. Plasmazellen und nicht naive B-Lymphozyten produzieren Antikörper. Dies entspricht der These von Greenberg SA et al. (31). In der vorliegenden Arbeit fanden sich bei der PM in allen untersuchten Akkumulationszonen mehr Plasmazellen als B-Lymphozyten. Bei der IBM fanden sich perimysial, endomysial kompakt und endomysial diffus mehr Plasmazellen als B-Lymphozyten.

In der vorliegenden Arbeit findet man einen Hinweis auf eine stärkere humorale Immunantwort bei PM und IBM als bei DM oder dem Jo-1-Syndrom bei Betrachtung der Summe aus B-Lymphozyten und Plasmazellen. Es waren mehr B-Zelllinien-Zellen bei der PM und IBM in allen Akkumulationszonen zu finden als bei DM oder dem Jo-1-Syndrom. Dies könnte dafür sprechen, dass bei der DM die Entzündungsreaktion im Muskel eher sekundär auf eine primäre Muskelischämie folgt und beim Jo-1-Syndrom sekundär, da vermutlich das Antigen Jo-1 zuerst außerhalb der Muskulatur zur Entstehung der Immunreaktion führt (siehe Punkt 6.2.3).

Ein weiterer Hinweis auf eine stärkere Beteiligung der humoralen Immunantwort bei der PM könnte sich bei Betrachtung der Verteilung der B-Zelllinien-Zellen bei der PM ergeben. Bei der PM fanden sich die meisten B-

Zelllinien-Zellen endomysial (endomysial kompakt und endomysial diffus zusammen), wobei nur bei PM und IBM B-Lymphozyten und Plasmazellen zusammen mit anderen Immunzellen als endomysial kompakte Ansammlungen vorkamen. T-Lymphozyten kommen bei der PM vor allem endomysial und kaum perivaskulär vor (4). Die zelluläre Immunantwort spielt aber bei PM und IBM nach wie vor die stärkere und wichtigere Rolle.

Plasmazellen könnten vermutlich autoaggressive T-Lymphozyten unterstützen, indem der Immunprozess durch Antikörperausschüttung, Antigenpräsentation und Zytokinausschüttung stets aufs Neue angefacht wird (43). Nur bei der PM und der IBM fanden sich Plasmazellen in endomysial gelegenen kompakten Ansammlungen von Entzündungszellen, die teilweise Muskelfasern umzingelt haben (Abb. 19a und b). Bei der DM und dem Jo-1-Syndrom fanden sich keine endomysial kompakten Ansammlungen von B-Lymphozyten oder Plasmazellen.



**Abb. 19a und b:** Plasmazellen (braun) in einer endomysial kompakten Ansammlung von Entzündungszellen um eine Muskelfaser herum bei der PM (a) und IBM (b).

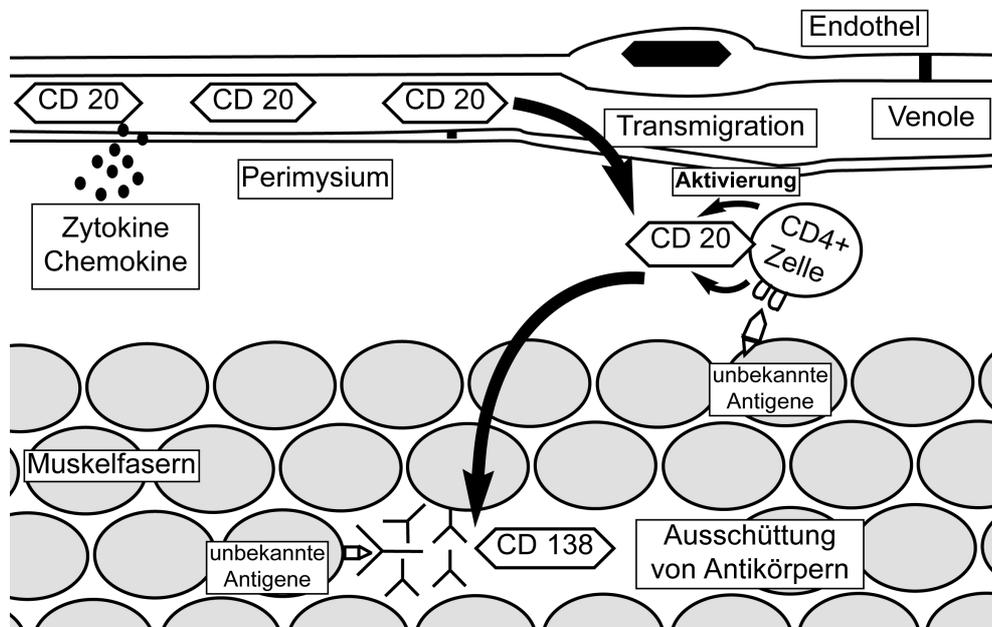
In der vorliegenden Arbeit entsprach das Verteilungsmuster der B-Lymphozyten bei der DM der bisherigen Beobachtung eines überwiegenden Auftretens perivaskulär und perimysial sowie geringstem Auftreten endomysial (4, 15). Plasmazellen waren in der vorliegenden Arbeit bei der DM in allen untersuchten Akkumulationszonen kaum vorhanden. Die größte Konzentration von Plasmazellen fand sich perimysial. Die Vermutung geht dahin, dass naive B-Lymphozyten aus größeren perimysial gelegenen

Venolen in den Muskel eindringen, mit Hilfe anderer Immunzellen, wie CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten aktiviert werden und sich dann überwiegend gegen Antigene auf Endothelzellen kleinerer Kapillaren richten, die vom Perimysium in das Endomysium übertreten. Außerdem sind Arteriolen und Venolen schichtweise aufgebaut. Zum Lumen hin liegen die Endothelzellen. Nach außen kommt je nach Durchmesser der Gefäße noch eine oder mehrere Lagen an glatten Muskelzellen und bei kaliberstärkeren Gefäßen noch eine Adventitia. Kapillaren bestehen nur aus einer Schicht von Endothelzellen (42). Eventuell könnte dadurch das endotheliale Antigen der Kapillaren exponierter sein, als das der größeren Arteriolen und Venolen.

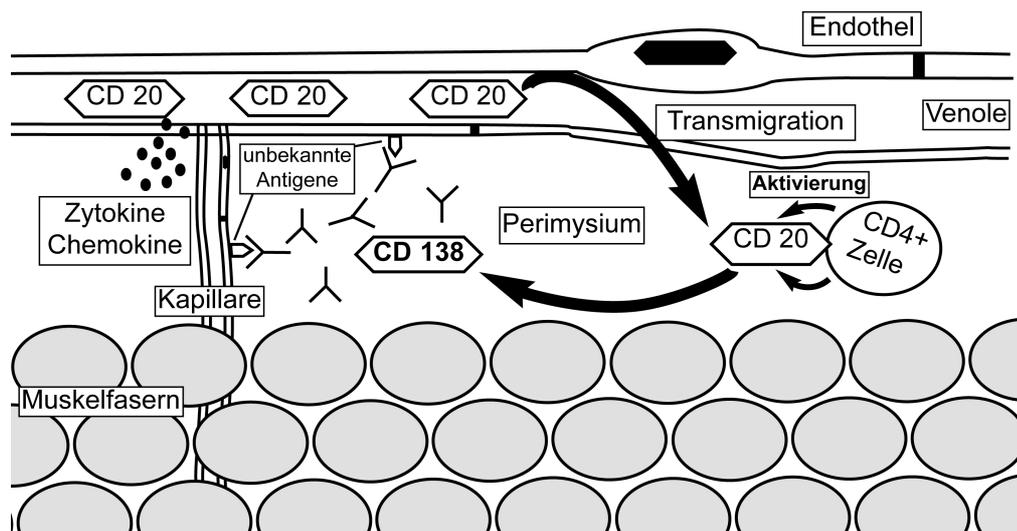
Die Beobachtung, dass sich endomysial bei der DM keine Plasmazellen fanden, könnte ebenfalls für eine überwiegend gegen endotheliale Antigene von perimysial gelegenen Blutgefäßen gerichtete Immunantwort sprechen.

Betrachtet man bei PM, IBM und DM den prozentualen Anteil von Plasmazellen von der Summe aus B-Lymphozyten und Plasmazellen, nahm dieser von perivaskulär nach perimysial zu. Wenn auch Mediane und Mittelwerte teils differieren, was sich durch die kleinen Fallzahlen erklären lässt, bleibt die daraus resultierende Aussage gleich.

Es wird angenommen, dass B-Lymphozyten durch Zytokine und Chemokine aus den Blutgefäßen angelockt werden, daraufhin im Muskel eine Aktivierung stattfindet aufgrund Antigenpräsentation durch andere, bereits am Entzündungsprozess beteiligte Immunzellen als auch durch Antigene auf Muskelfasern bei PM und IBM sowie Antigene auf Endothelzellen bei der DM.



**Abb. 20a: Polymyositis/Einschlußkörpermyositis.** Pathogenetische Überlegungen zum humoralen Anteil der Entzündungsreaktion: Naive B-Lymphozyten werden durch Zytokine und Chemokine angelockt, transmigrieren aus Venolen in den Muskel. Hier erfolgt die Aktivierung z.B. mit Hilfe von CD4<sup>+</sup>-Zellen. Plasmazellen migrieren nach endothelial, beginnen mit der Ausschüttung von Antikörpern, die gegen unbekannte Antigene auf Muskelfasern gerichtet sind. Unabhängig davon steht bei der PM und IBM der zelluläre Anteil der Entzündungsreaktion im Vordergrund.



**Abb. 20b: Dermatomyositis.** Pathogenetische Überlegungen: B-Lymphozyten werden durch Zytokine und Chemokine angelockt, transmigrieren aus Venolen in den Muskel. Hier erfolgt die Aktivierung. Plasmazellen schütten Antikörper aus, die gegen unbekannte Zielantigene auf Endothelzellen von perimysialen Venolen, anderen perimysialen Blutgefäßen und Kapillaren gerichtet sind.

### 6.2.3. Jo-1-Syndrom mit Myositis

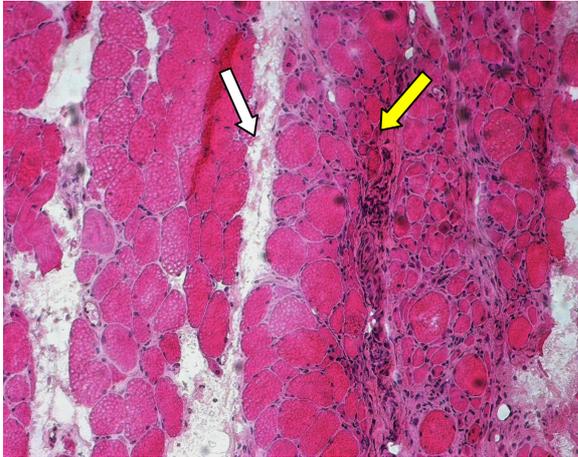
Die pathogenetische Rolle der Jo-1-Antikörper ist noch nicht ganz geklärt. Wie bereits in der Einleitung unter Punkt 1.3 geschildert, wurden Jo-1-Antikörper bisher als myositisspezifische Antikörper angesehen, die bei einem Teil von Patienten mit PM oder DM auftauchen können (27). Jo-1 ist verantwortlich für den Einbau der Aminosäure Histidin in Proteine (28). Diese Funktion wird durch die Jo-1-Antikörper gestört (58). Es wurde gezeigt, dass Jo-1 ein stimulierendes Antigen für die Entwicklung einer Myositis ist (56). Jo-1 kommt aber zytoplasmatisch vor und ist nicht mit dem Zytoskelett der Zellen assoziiert (75, 78). Wie kann also ein zytoplasmatisch vorkommendes Antigen eine Immunreaktion auslösen? Transgene Mäuse, bei denen die MHC-I-Expression auf der Oberfläche von Muskelfasern künstlich hochreguliert wurde, entwickelten eine Myositis, zum Teil auch mit positivem Nachweis von Jo-1-Antikörpern (62). Man vermutete, dass alleine die Dauer der MHC-I-Überexpression und der Kontext der Überexpression ausreichen, um eine Myositis auszulösen (62). MHC-I präsentiert Autoantigene. Bei einer Hochregulierung von MHC-I könnten auch Fragmente von Jo-1 präsentiert werden und somit die Immunreaktion auslösen.

Ein anderer Ansatzpunkt wäre eine Freisetzung von Jo-1 aus beschädigten Muskeln. Es konnte gezeigt werden, dass regenerierende Muskelfasern, die bei einer Myositis ja zu einem höheren Maß vorkommen, verschiedene Autoantigene, unter anderem Jo-1, exprimieren (9). Ist Jo-1 erst einmal freigesetzt, kann es zu einer Immunantwort unter bestimmten Voraussetzungen kommen. Eine Hypothese ist die des molekularen Mimikry, das heißt, daß Jo-1 einem körperfremden Antigen ähnlich ist und somit eine Kreuzreaktion ausgelöst wird, wobei sich das Immunsystem nun auch gegen ein körpereigenes Antigen richten kann (27, 28). Eine gewisse Homologie zwischen Aminosäuresequenzen von Jo-1 und Polyproteinen des Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) wurde bereits beschrieben (80). Eine Expression von Jo-1 in myositisassoziierten Tumoren, wie Adenokarzinomen der Mamma und Lungentumoren, wurde auch beschrieben, so dass eine primäre Immunantwort gegen Tumoren zu einer Myositis führen könnte (9). Jo-1

kann auch Chemokin-Rezeptoren auf T-Lymphozyten und dendritischen Zellen aktivieren und somit die Entwicklung der Myositis ankurbeln (41). Fragmente von Jo-1 können selbst als Chemokine agieren und somit Immunzellen anlocken (79).

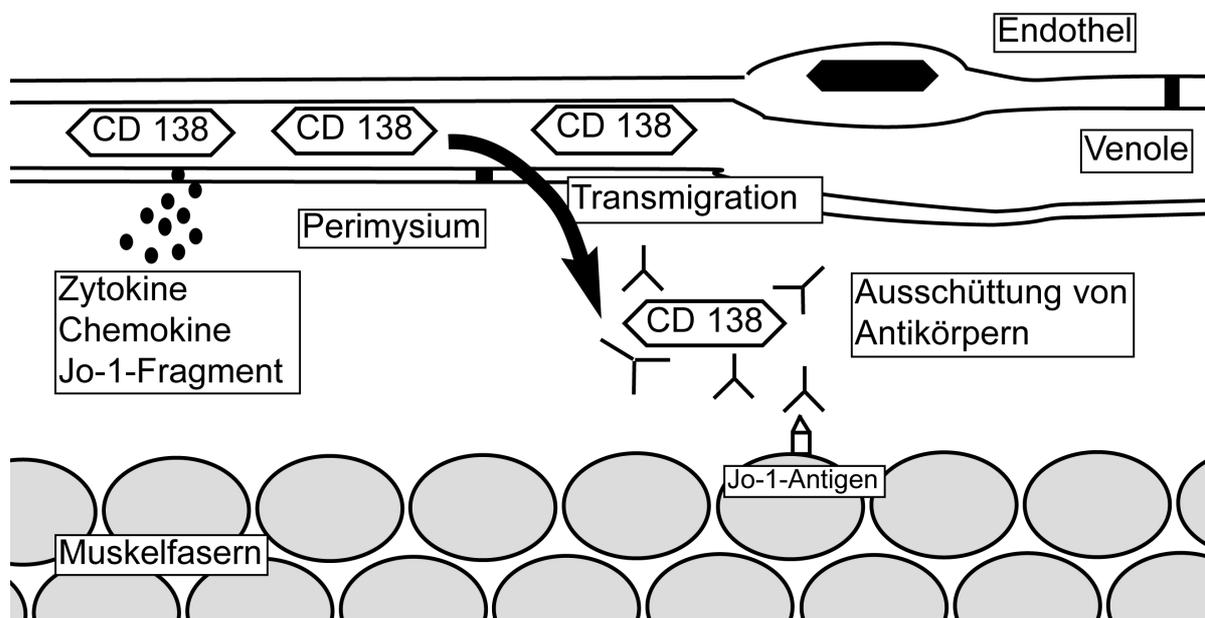
In mehreren Arbeiten wird nun diskutiert, daß es sich beim Jo-1-Syndrom um eine eigene Krankheitsentität handeln könnte. Anhand von histopathologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß es beim Jo-1-Syndrom zu einer überwiegend perimysialen Entzündungsreaktion und perimysialen Bindegewebsfragmentation kommt. Es wurde deswegen die Hypothese aufgestellt, daß Bindegewebe und nicht Muskelfasern primärer Angriffspunkt der Immunreaktion ist (60). Es wurde auch spekuliert, dass sich Antikörper nach Freisetzung von Jo-1-Fragmenten gegen das gesamte Jo-1 durch „Epitope Spreading“ (siehe Punkt 1.3.) bilden könnten und es dadurch zur Autoimmunerkrankung kommt. Dies würde aber bedeuten, daß das Immunsystem selbst und nicht der Muskel zur primären Antigenexpression beitragen könnte (36). So könnten Anti-Jo-1-Autoantikörper als Marker einer eigenen spezifischen Myositiserkrankung dienen (36).

Die vorliegende Arbeit unterstützt die Hypothese, daß es sich beim Jo-1-Syndrom um ein eigenständiges Krankheitsbild handelt, aufgrund von spezifischen histopathologischen Veränderungen und dem Verteilungsmuster der Entzündungszellen, insbesondere von B-Lymphozyten und Plasmazellen. In der HE-Färbung der Patienten mit Jo-1-Syndrom erkannte man eine perimysiale Bindegewebsfragmentation, eine überwiegend perimysiale Entzündungsreaktion und Atrophie von an das Perimysium angrenzender Muskelfasern. Der für eine PM oder IBM typische Komplex aus MHC-I und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen war kaum zu finden.



**Abb. 21:** Jo-1-Syndrom, Patient 10, 1:10 vergrößert. Perimysiale Bindegewebsfragmentation (weißer Pfeil), Entzündungsreaktion im Perimysium und angrenzender Bereiche von Muskelfasern (gelber Pfeil).

Betrachtet man alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Entzündungszellen, also  $CD4^+$ -T-Lymphozyten,  $CD8^+$ -T-Lymphozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten und Plasmazellen fiel die Stärke der Immunantwort beim Jo-1-Syndrom geringer aus als bei der PM oder der IBM. Beim Jo-1-Syndrom sollte das Verteilungsmuster der B-Zelllinien-Zellen entweder dem von der PM oder der DM folgen, was aber nicht der Fall war. Bei Betrachtung des prozentualen Anteils von Plasmazellen von der Summe aus B-Lymphozyten und Plasmazellen fanden sich nur beim Jo-1-Syndrom mehr Plasmazellen perivaskulär als bei PM, DM oder IBM. Plasmazellen könnten außerhalb des Muskels aktiviert werden und anschließend in den Muskel einwandern, um eine Entzündungsreaktion auszulösen. Dafür spricht auch die Tatsache, dass beim Jo-1-Syndrom andere Organe, wie Lunge, Gelenke und Haut beteiligt sein können, Muskel nicht unbedingt beteiligt sein muss (5, 52, 66). Naive B-Lymphozyten könnten in sekundären lymphatischen Organen mit Hilfe von antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen oder  $CD4^+$ -T-Helferzellen aktiviert werden. Jo-1 kann die Migration von solchen Zellen induzieren (41). Von Muskelfasern via MHC-I exprimiertes Jo-1, Chemokine und Zytokine könnten Plasmazellen in den Muskel locken. Plasmazellen transmigrieren dann durch das Endothel und schütten Antikörper aus. Dies führt zur Entstehung einer Immunkaskade mit immer neuer Aktivierung weiterer immunkompetenter Zellen.



**Abb. 22: Jo-1-Syndrom.** Pathogenetische Überlegungen zum humoralen Anteil der Entzündungsreaktion: Plasmazellen werden durch Jo-1-Fragmente, Chemo- und Zytokine angelockt, transmigrieren durch das Endothel, verbreiten sich überwiegend perimysial und schütten Antikörper aus, die gegen das Jo-1-Antigen auf überwiegend an das Perimysium angrenzenden Muskelfasern gerichtet sind.

## 7. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

PM und IBM betrachtet man als T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, im Gegensatz dazu ist die DM eher B-Zell-vermittelt (humoral). Beim Jo-1-Syndrom besteht die Besonderheit, daß eine Antikörpervermittelte Immunantwort als auch eine zelluläre Immunreaktion bedeutsam ist, diese Erkrankung also zwischen PM und DM steht.

B-Lymphozyten waren bisher bei PM und IBM kaum gefunden worden, deshalb ging man davon aus, dass PM und IBM aufgrund einer ausschließlich zellulären Immunantwort entstehen. Plasmazellen, die nach Aktivierung aus B-Lymphozyten entstehen, sezernieren Antikörper und tragen dadurch zur Entzündungsreaktion bei. Greenberg SA et al. zeigten, dass bei PM und IBM mehr Plasmazellen als B-Lymphozyten vorkommen, dadurch angenommen werden kann, dass die humorale Immunantwort doch eine größere Rolle

spielen könnte (31). Diese Annahme konnte durch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit bestärkt werden, da bei PM und IBM weitaus mehr B-Lymphozyten und Plasmazellen an der Entzündungsreaktion beteiligt waren als bei DM oder Jo-1-Syndrom.

Die Vermutung, dass humorale Immunmechanismen bei der PM eine größere Rolle spielen, als bisher angenommen wurde, ergab sich auch aus der Betrachtung des prozentualen Anteils von Plasmazellen von der Summe aus B-Lymphozyten und Plasmazellen. Perimysial, in an das Perimysium angrenzende Bereiche der Muskelfasern sowie endomysial zeigen sich mehr Plasmazellen als B-Lymphozyten.

Nichtsdestotrotz ist die zelluläre Entzündungsreaktion bei der PM und IBM ausgeprägter als die humorale Immunreaktion, da sich eine stärkere Infiltration von T-Zellen als von B-Lymphozyten oder Plasmazellen zeigte. Eine Trennung von zellulärer und humoraler Immunantwort ist sinnvoll, aber die Immunantworten können sich überlappen (21).

Ein Merkmal zur Diagnosestellung einer IBM ist das Vorkommen von COX-negativen Fasern(14,70). Bei der IBM konnten in der vorliegenden Arbeit vermehrt COX-negative Fasern beobachtet werden.

Die Vermutung, dass die Entzündungsreaktion bei DM und Jo-1-Syndrom sekundär ist, bei der DM eher bedingt durch eine Immunreaktion gegen Endothelzellen und eine konsekutive Muskelischämie, beim Jo-1-Syndrom durch eine außerhalb des Muskels stattgefundene Aktivierung autoaggressiver Immunzellen, ergab sich aus der Beobachtung, dass die gesamte Entzündungsreaktion bei DM und Jo-1-Syndrom geringer ausfiel als bei PM und IBM.

Die Annahme, dass bei der PM und der IBM B-Lymphozyten aus Blutgefäßen in den Muskel transmigrieren, von antigenpräsentierenden Zellen vor Ort zu Plasmazellen aktiviert werden und dann zusammen mit T-Lymphozyten gegen die selben muskulären Antigene gerichtet sind, ergab sich aus der Beobachtung, dass der prozentuale Anteil von Plasmazellen von der Summe aus B-Lymphozyten und Plasmazellen auf dem Weg von Bereichen um perimysial gelegene Blutgefäße herum in das Perimysium und in an das Perimysium angrenzende Bereiche von Muskelfasern stieg, somit

eine Aktivierung erfolgt sein könnte. Endomysial waren bei der PM nahezu gleich viele Plasmazellen als perimysial vorhanden, bei der IBM fiel der prozentuale Anteil an Plasmazellen wieder leicht ab.

Man kann annehmen, dass auch bei der DM B-Lymphozyten aus den Blutgefäßen transmigrieren und eine Aktivierung vor Ort in der Nähe der perimysial gelegenen größeren Blutgefäße und Kapillaren stattfindet, da sich perimysial mehr Plasmazellen, perivaskulär mehr B-Lymphozyten fanden. Aufgrund der überwiegend perimysialen Immunreaktion könnten Endothelzellen von Kapillaren primärer Angriffspunkt sein.

Die Annahme, daß bei der DM Kapillaren stärker von der Entzündungsreaktion betroffen sind als perimysial gelegene größere Blutgefäße, ergibt sich aus der Beobachtung, daß perimysial mehr Plasmazellen als perivaskulär zu finden sind. Kapillaren gehen von größeren perimysial gelegenen Blutgefäßen ab und ziehen in die Muskelfaszikel. Kapillaren sind nur aus einer Endothelschicht aufgebaut, bei kaliberstärkeren perimysialen Blutgefäßen liegen eine Schicht aus glatten Muskelfasern und eventuell eine Adventitia über dem Endothel. Dadurch könnten endotheliale Autoantigene der Kapillaren exponierter sein.

Man könnte vermuten, dass beim Jo-1-Syndrom eine Aktivierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen bereits außerhalb des Muskels stattgefunden hat, da sich nur beim Jo-1-Syndrom perivaskulär mehr Plasmazellen als bei PM, DM oder IBM fanden.

Die histopathologischen Veränderungen mit perimysialer Bindegewebsfragmentation, Tendenz zur Atrophie von an das Perimysium angrenzenden Muskelfasern und einzigartigem Verteilungsmuster von B-Lymphozyten und Plasmazellen mit einer hohen Plasmazellpräsenz lassen die Annahme zu, dass es sich beim Jo-1-Syndrom um eine eigenständige Krankheitsform handelt.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Albert LJ, Inman RD: Molecular Mimicry and Autoimmunity. *N Engl J Med* 341 (1999) 2068-2074
2. Amemiya K, Granger RP et al.: Clonal restriction of T-cell receptor expression by infiltrating lymphocytes in inclusion body myositis persists over time. Studies in repeated muscle biopsies. *Brain* 123 (2000) 2030-2039
3. Anderson KC, Bates MP et al.: Expression of Human B Cell-Associated Antigens on Leukemias and Lymphomas: A Model of Human B Cell Differentiation. *Blood* 63 (1984) 1424-1433
4. Arahata K, Engel AG: Monoclonal Antibody Analysis of Mononuclear Cells in Myopathies. I: Quantitation of Subsets According to Diagnosis and Sites of Accumulation and Demonstration and Counts of Muscle Fibers Invaded by T Cells. *Ann Neurol* 16 (1984) 193-208
5. Aschermann DP: The Role of Jo-1 in the Immunopathogenesis of Polymyositis: Current Hypotheses. *Curr Rheumatol Reports* 5 (2003) 425-430
6. Boehnisch T: Färbemethoden. In: Naish SJ (Hrsg) et al.: *Handbuch II immunhistochemischer Färbemethoden*. DAKO Corporation, 3. Auflage, 1997, S. 22-28
7. Bohan A, Peter JB: Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med* 292 (1975) 344 – 347
8. Bradshaw EM, Orihuela A et al.: A Local Antigen-Driven Humoral Response Is Present in the Inflammatory Myopathies. *J Immunol* 178 (2007) 547-556
9. Casciola-Rosen L, Nagaraju K et al. : Enhanced autoantigen expression in regenerating muscle cells in idiopathic inflammatory myopathy. *J Exp Med* 201 (2005) 591-601
10. Choi YC, Dalakas MC: Expression of matrix metalloproteinases in the muscle of patients with inflammatory myopathies. *Neurology* 54 (2000) S. 65-71

11. Dalakas MC, Sivakumar K: The immunopathologic and inflammatory differences between Dermatomyositis, polymyositis and sporadic inclusion body myositis. *Curr Opin Neurol* 9 (1996) 235 – 239
12. Dalakas MC, Illa I et al.: Inclusion body myositis and paraproteinemia: incidence and immunopathologic correlations. *Ann Neurology* 41 (1997) 100-104
13. Dalakas MC: Progress in inflammatory myopathies: good but not good enough. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79 (2001) 569-573
14. Dalakas MC, Karpati G: The inflammatory myopathies. In: Karpati G, Hilton-Jones D, Griggs RC (Eds): *Disorders of Voluntary Muscle*. 7. Auflage. Cambridge University Press, 2001, S. 636-659
15. Dalakas MC, Hohlfeld R: Seminar: Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 362 (2003) 971-982
16. Dalakas MC: Inflammatory disorders of muscle: progress in polymyositis, dermatomyositis and inclusion body myositis. *Curr Opin Neurol* 17 (2004) 561-567
17. Dalakas MC: Molecular pathogenesis of inflammatory myopathies and future therapeutic strategies. *Advances in Clin Neurophys* 57 (2004) 288-303
18. Dalakas MC: Inflammatory, immune, and viral aspects of inclusion-body myositis. *Neurology* 66 (2006) 33-38
19. Dalakas MC: B cells in the pathophysiology of autoimmune neurological disorders: A credible therapeutic target. *Pharm & Therap* 112 (2006) 57-70
20. Dalakas MC, Rakocevic G et al.: Inclusion body myositis with human immunodeficiency virus infection : four cases with clonal expansion of viral-specific T cells. *Ann Neurol* 61 (2007) 466-475
21. Davidson A, Diamond B: Autoimmune Diseases. *N Engl J Med* 345 (2001) 340-350
22. De Bleeker JL, Creus KK et al.: Potential Therapeutic Targets for Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Drug News Perspect* 19 (2006) 549 – 557

23. Dighiero G, Rose NR: Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity. *Immunol Today* 20 (1999) 423-428
24. Dimitri D, Benveniste O et al.: Shared blood and muscle CD8+ T-cell expansions in inclusion body myositis. *Brain* 129 (2006) 986-995
25. Dubowitz V, Sewry CA: Inflammatory Myopathies. In: Dubowitz V, Sewry CA (Eds): *Muscle Biopsy. A Practical Approach*. 3. Auflage, Saunders Elsevier, 2007, S. 519-539
26. Engel AG, Arahata K: Monoclonal Antibody Analysis of Mononuclear Cells in Myopathies. II: Phenotypes of Autoinvasive Cells in Polymyositis and Inclusion Body Myositis. *Ann Neurol* 16 (1984) 209-215
27. Engel AG, Hohlfeld R, Banker Q: Chapter 51: The Polymyositis and Dermatomyositis Syndromes. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C (Eds): *Myology*, 3. Auflage, McGraw Hill Inc., 2004, S. 1335-1383
28. Freist W, Verhey JF et al.: Histidyl-tRNA Synthetase. *Biol Chem* 380 (1999) 623-646
29. Goebels N, Michaelis D et al.: Differential Expression of Perforin in Muscle-infiltrating T Cells in Polymyositis and Dermatomyositis. *J Clin Invest* 97 (1996) 2905-2910
30. Goldrath AW, Benvan MJ: Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402 (1999) 255-262
31. Greenberg SA, Bradshaw EM et al.: Plasma cells in muscle in inclusion body myositis and polymyositis. *Neurology* 65 (2005) 1782-1787
32. Greenberg SA, Pinkus JL et al. : Interferon- $\alpha/\beta$ -Mediated Innate Immune Mechanism in Dermatomyositis. *Ann Neurol* 57 (2005) 664-678
33. Griggs RC, Askanas V et al.: Inclusion Body Myositis and Myopathies. *Ann Neurol* 38 (1995) 705-713
34. Grundtman C, Malmström V et al.: Immune mechanisms in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Research & Therapy* 9 (2007) 208-219

35. Haidong L, Ayer LM et al.: The CD20 Calcium Channel Is Localized to Mikrovilli and Constitutively Associated with Membrane Rafts. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 19893-19901
36. Hengstman GJD, van Engelen BGM et al.: Myositis specific autoantibodies: changing insights in pathophysiology and clinical associations. *Curr Opin Rheumatology* 16 (2004) 692-699
37. Hohlfeld R, Toyka KV et al.: Human T-helper lymphocytes in myasthenia gravis recognize the nicotinic receptor  $\alpha$  subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (1987) 5379-5383
38. Hohlfeld R, Engel AG: Induction of HLA-DR expression on human myoblasts with interferon gamma. *Am J Pathol* 136 (1990) 503-508
39. Hohlfeld R, Engel AG et al.: Cellular immune mechanisms in inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatology* 9 (1997) 520-526
40. Hoogendijk JE, Amato AA et al.: 119<sup>th</sup> ENMC international workshop: Trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with exception of inclusion body myositis, 10 – 12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders* 14 (2004) 337-345
41. Howard OMZ, Dong HF et al.: Histidyl-tRNA Synthetase and Asparaginyl-tRNA Synthetase, Autoantigens in Myositis, Activate Chemokine Receptors on T Lymphocytes and Immature Dendritic Cells. *J Exp Med* 196 (2002) 781-791
42. Hudlicka O, Brown MD, Egginton S: Chapter 22: Microcirculation in Muscle. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C (Eds): *Myology*, 3. Auflage, McGraw Hill Inc., 2004, S. 511-533
43. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Chapter 9: The Humoral Response. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (Eds): *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 5. Auflage, Garland Publishing, 2001, S. 341-380
44. Janeway SA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Chapter 13, Autoimmunity and Transplantation. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (Eds): *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 5. Auflage, Garland Publishing, 2001, S. 501-552

45. Kärre K: MHC Class I molecules and the missing self. *Scand J of Immunology* 55 (2002) 221-228
46. Kaufmann J, Hunzelmann N et al.: Das klinische Spektrum der Dermatomyositis. *JDDG* 3 (2005) 181-194
47. Klein J, Sato A: The HLA System. First of Two Parts. *The New England J of Medicine* 34 (2000) 702-709
48. Lanzavecchia A: Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 8 (1990) 637-685
49. Leff RL, Love LA et al.: Viruses in the idiopathic inflammatory Myopathies: absence of candidate viral genomes in muscle. *Lancet* 339 (1992) 1192-1195
50. Leon-Monzon M, Illa I et al.: Polymyositis in patients infected with HTLV-I: The role of the virus in the cause of the disease. *Ann Neurol* 36 (1994) 643-649
51. Liang B, Mamula MJ: Molecular mimicry and the role of B lymphocytes in the processing of autoantigens. *Cell Mol Life Sci* 57 (2000) 561-568
52. Love LA, Leff RL et al.: A New Approach to the Classification of Idiopathic Inflammatory Myopathy: Myositis-Specific Autoantibodies Define Useful Homogeneous Patient Groups. *Medicine* 70 (1991) 360-374
53. Mackay F, Silveira PA, Brink R: B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling. *Curr Opin Immunology* 19 (2007) 327-336
54. Mackay I: The HLA system First of two parts. *NEJM* 343 (2000) 702-709
55. Mantegazza R, Andreetta F et al.: Analysis of T cell receptor repertoire of muscle-infiltrating T lymphocytes in Polymyositis. Restricted V alpha/beta rearrangements may indicate antigen-driven selection. *J Clin Invest* 91 (1993) 2880-2886
56. Martin A, Shulman MJ et al.: Epitope studies indicate that histidyl-tRNA synthetase is a stimulating antigen in idiopathic myositis. *FASEB J* 9 (1995) 1226-1233

57. Mastaglia FL, Phillips BA: Idiopathic Inflammatory myopathies: epidemiology, classification, and diagnostic criteria. *Rheum Dis N Am* 28 (2002) 723 – 741
58. Mathews MB, Bernstein RM: Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA-synthetase: A model for autoimmunity. *Nature* 304 (1983) 177-179
59. Michaelis D, Goebels N et al.: Constitutive and cytokine-induced expression of human leukocyte antigens and cell adhesion molecules by human myotubes. *Am J Pathol* 143 (1993) 1142-1149
60. Mozaffar T, Pestronk A: Myopathy with anti-Jo-1 antibodies: pathology in perimysium and neighbouring muscle fibres. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68 (2000) 472-478
61. Nagaraju K, Raben N et al. : Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies. *PNAS* 97 (2000) 9209-9214
62. Nagaraju K, Casciola-Rosen L et al.: Activation of the endoplasmatic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction. *Arthritis Rheum* 52 (2005) 1824-1835
63. Needham M, Mastaglia FL: Inclusion Body Myositis: current pathogenetic concepts and diagnostic and therapeutic approaches. *Lancet Neurol* 6 (2007) 620-631
64. O Connell FP, Pinkus JL et al.: CD138 (Syndecan-1), a Plasma Cell Marker. *Am J Clin Pathol* 121 (2004) 254-263
65. Ogarawa K, Kuwabara S et al.: Axonal Guillain-Barré syndrome: relation to anti-ganglioside antibodies and *Camphylobacter jejuni* infection in Japan. *Ann Neurol* 48 (2000) 624-631
66. O'Neill TW, Maddison PJ et al.: Rheumatoid-arthritis associated with myositis and anti-Jo-1 antibody. *Clin Rheumatol* 20 (1993) 141-143
67. Pongratz D, Späth M: Entzündliche Muskelkrankheiten. In: Pongratz D, Zierz S (Hrsg): *Neuromuskuläre Erkrankungen*. Deutscher Ärzte-Verlag Köln, 2003, S. 140-158

68. Sanderson RD, Lator P et al.: B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regulation* 1 (1989) 27-35
69. Sandstedt PE, Henriksson KG et al.: Quantitative electromyography in polymyositis and dermatomyositis. *Acta Neurol Scand* 65 (1982) 110-121
70. Santorelli FM, Sciacco M et al.: Multiple mitochondrial DNA deletions in sporadic inclusion body myositis: A study of 56 patients. *Ann Neurol* 39 (1996) 789-795
71. Schmidt WA, Werzel W et al.: Clinical and serological aspects of patients with anti-Jo-1 antibodies - an evolving spectrum of disease manifestations. *Clin Rheumatol* 19 (2000) 371-377
72. Seiberlich B, Hunzelmann N, Roers A et al.: Das Jo-1-Syndrom und seine klinischen Manifestationen. *Medizinische Klinik* 100 (2005) 137-142
73. Sfikakis PP, Boletis JN et al.: Remission of proliferative lupus nephritis following B cell depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell costimulatory molecule CD40 ligand: an open-label trial. *Arthritis Rheum* 52 (2005) 501-513
74. Stashenko P, Nadler LM et al.: Expression of cell surface markers after human B lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 6 (1981) 3848-3852
75. Targoff IN: Autoantibodies to Aminoacyl-Transfer RNA synthetases for isoleucine und glycine. *J Immunol* 144 (1990) 1737-1743
76. Targoff IN, Miller FW et al.: Classification criteria for the idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumat* 9 (1997) 527-535
77. van der Pas J, Hengstman GJD et al.: Diagnostic value of MHC class I staining in idiopathic inflammatory Myopathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75 (2004) 136-139
78. Vasquez-Abad D, Carson JH et al. : Localization of histidyl-tRNA synthetase (Jo-1) in human laryngeal epithelial carcinoma cell line (Hep-2 cells). *Cell Tissue Res* 286 (1996) 487-491

79. Wakasugi K, Schimmel P: Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase. *J Biol Chem* 274 (1999) 23155-23159
80. Walker EJ, Jeffrey PD: Polymyositis and molecular mimicry, a mechanism of autoimmunity. *Lancet* 2 (1986) 605-607
81. Whitaker JN: Inflammatory myopathy : A review of etiologic and pathogenetic factors. *Muscle Nerve* 5 (1982) 573-592
82. Wiendl H, Malotka J et al.: An autoreactive  $\gamma\delta$  TCR Dreived from a Polymyositis Lesion. *J Immunology* 169 (2002) 515-521
83. Zampieri S, Ghirardello A et al.: Anti-Jo-1 Antibodies. *Autoimm* 38 (2005) 73-38
84. Zierz S, Jerusalem F: Entzündliche Muskelerkrankungen. In: Zierz S, Jerusalem F (Hrsg): *Muskelerkrankungen*, 3.Auflage, Thieme-Verlag, 2003, S. 191-209

## 8. Thesen

1. Es gibt Hinweise an kleinen Fallzahlen, dass humorale Immunmechanismen bei PM und IBM eine größere Rolle spielen als bisher angenommen. Ob Antikörper und zytotoxische T-Zellen gegen dasselbe muskuläre Antigen gerichtet sind, ist offen.
2. Bei der DM spielen überwiegend humorale Abwehrmechanismen bei der Krankheitsentstehung eine Rolle. Das Verteilungsmuster der B-Lymphozyten und Plasmazellen mit größter Konzentration perimysial entspricht der allgemein diskutierten Annahme, daß Antigene auf Endothelzellen der perimysial gelegenen Muskelgefäße primärer Angriffspunkt der Entzündungsreaktion sind, Muskel eher sekundär durch die Entzündungsreaktion geschädigt wird.
3. Bei Betrachtung des Verhältnisses von B-Lymphozyten zu Plasmazellen bei PM, DM und IBM kann man eine Aktivierung der B-Lymphozyten und Umwandlung zu Plasmazellen im Muskel selbst annehmen
4. Plasmazellen bei der PM und IBM sind perimysial und endomysial am häufigsten zu finden als möglicher Hinweis darauf, dass von Plasmazellen produzierte Antikörper gegen ein oder mehrere muskuläre Antigene gerichtet sind.
5. Betrachtet man das Verhältnis von B-Lymphozyten zu Plasmazellen beim Jo-1-Syndrom, finden sich in der perivaskulären Akkumulationszone bereits mehr Plasmazellen als B-Lymphozyten. Daraus kann man schlussfolgern, daß eine Aktivierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen außerhalb des Muskels stattgefunden hat.

Die histopathologischen Veränderungen als auch das Verteilungsmuster von B-Lymphozyten und Plasmazellen beim Jo-1-Syndrom sind für diese Erkrankung einzigartig, so daß es sich um eine eigenständige Krankheitsentität zu handeln scheint.

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE ANGABEN

---

Geburtsdatum 03.12.1972  
Geburtsort München  
Familienstand verheiratet  
Nationalität deutsch

### BERUFLICHER WERDEGANG

---

Seit 07/2002 Assistenzarzt in der Neurologischen Klinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
08/02 – 07/04 und 10/05 – 09/06:  
Neurologische Intensivstation  
08/04 – 03/05 und 09/07 – 08/08:  
Neurologische Allgemeinstation  
04/05 – 09/05:  
Neurologische Doppler- und Duplexsonographie  
10/06 – 08/07: Neurophysiologie

07/2002 Approbation

01/2000 – 06/2002 Arzt im Praktikum, Neurologische Klinik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

10/1999 – 09/2000 Praktisches Jahr:  
1. Tertial: Städtisches Krankenhaus München-Harlaching, Neurologie  
2. Tertial: Universitätsklinikum München-Großhadern, Herzchirurgie und Abdominalchirurgie  
3. Tertial: Kantonsspital Luzern (CH), Innere Medizin

1993 – 2000 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

### WISSENSCHAFTLICHES ENGAGEMENT

---

2002 – 2008 Studienarzt einer internationalen multizentrischen Arzneimittelstudie zur Therapie von Patienten mit amyotropher Lateralsklerose

### VERÖFFENTLICHUNGEN

---

2006 Swalwell H., Deschauer M., Hartl H. et al.: „Pure myopathy associated with a novel mitochondrial tRNA gene mutation“. *Neurology* 2006 Feb 14; 66(3): 447-9

2003 Heckmann JG., Lang CJ., Hartl H. et al.: „Multiple brain abscesses caused by *Fusobacterium nucleatum* treated conservatively“. *Can J Neurol Sci* 2003 Aug.; 30 (3): 266-8

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen entsprechend gekennzeichnet habe. Weder diese noch eine andere Dissertation wurde von mir an einer anderen Fakultät zum Zwecke der Promotion eingereicht.

Halle, 27.08.2008

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. S. Zierz für seinen wertvollen Rat.

Weiterhin danke ich Frau K. Zietz, Frau Dr. K. Traufeller, Herrn PD Dr. M. Kornhuber und meiner Ehefrau Ingrid Lommer für die Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit.