

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie

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

(Direktor: Prof. Dr. med. Stephan Zierz)

**Myositis nach intramuskulärer
Injektion des Superantigens gp120 bei der Lewis-Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Susanne Hirsch

geboren am 24.08.1986 in Halle/Saale

Betreuer: Prof. Dr. med. M. E. Kornhuber

Gutachter:

Prof. Dr. med. Malte E. Kornhuber. Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie. Halle/Saale

PD Martin Staeger. Universitätsklinik und Poliklinik für Pädiatrie. Halle/Saale

Prof. Hans-Anton Lehr. Institut für klinische Pathologie. Lausanne

Eröffnung des Verfahrens: 07.07.2015

Datum der Verteidigung: 25.04.2016

Referat

Die Ursache autoimmuner Myositiden ist ungeklärt. In den letzten Jahren sind endogene Retroviren und deren Hüllproteine mit mutmaßlich superantigenen Eigenschaften zunehmend in den Fokus der Ursachenforschung gerückt. Superantigene können eine besonders starke Immunantwort auslösen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein retrovirales Superantigen (gp120 des HI-Virus) eingesetzt, um dessen myositogene Eigenschaften zu charakterisieren. 13 Lewis-Ratten wurde gp120 intramuskulär (M. quadriceps femoris) injiziert. Acht Tiere wurden als Kontrollgruppe mit einer Lösungsmittelinjektion ohne gp120 behandelt. Die Tiere wurden am ersten, dritten und zehnten Tag nach intramuskulärer Injektion von gp120 bzw. Lösungsmittel geopfert. Die immunhistochemisch gefärbten Muskelschnitte wurden histologisch systematisch auf das Vorhandensein einer lymphozytären Entzündungsreaktion sowie hinsichtlich der Verteilung der Oberflächenmarker CD3, CD4 und CD8 untersucht. Die Entzündungsreaktion wurde mittels des vierstufigen Scores nach Matsumoto klassifiziert (Matsumoto et al., 2007).

Gp120 löst anders als konventionelle Antigene ohne weiteres Adjuvans eine ausgeprägte, endomysial gelegene Entzündungsreaktion aus. Die Entzündungsreaktion ist überwiegend von CD4- und CD8-positiven T-Zellen geprägt. In geringem Ausmaß invadieren diese Zellen in nicht-nekrotische Muskelfasern. Der Oberflächenmarker CD3 der T-Zellen ist im Vergleich zu CD4 beziehungsweise CD8 unterexprimiert. In der Gruppe der mit gp120-behandelten Tiere wurde am dritten Tag der Beobachtung eine deutlich höhergradige Entzündungsreaktion (Scorewert $3,00 \pm 0,00$) beobachtet als in der Kontrollgruppe, die lediglich in einen Scorewert von $1,67 \pm 0,58$ aufwies. Dieser Unterschied erwies sich als statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die Auswertung der jeweiligen Lymphozytenantigene ergab einen signifikant höheren Anteil ($p < 0,05$) an CD8-positiven T-Zellen bei den mit gp120 behandelten Tieren an Tag eins (59,1% vs. 27,5%) und Tag drei (43,7% vs. 3,9%) der Untersuchungen. Histologisch ähnelt das Entzündungsinfiltrat der durch gp120 ausgelösten Myositis dem einer Polymyositis. Da gp120 ein (retro)virales Superantigen ist, liegt es nahe, dass derartige Superantigene eventuell bei der Entstehung einer Polymyositis beteiligt sind. Superantigene können jeweils T-Zellen oder B-Zellen bzw. auch gleichzeitig beide Zellpopulationen stimulieren. Es ist daher möglich, dass unterschiedliche Superantigene unterschiedliche Arten von Myositiden hervorrufen können. Diese Tatsache hat eventuell Implikationen für die unterschiedlichen Arten autoimmuner Myositiden.

Hirsch, Susanne: Myositis nach intramuskulärer Injektion des Superantigens gp120 bei der Lewis Ratte

Halle(Saale), Univ., Med., Fak., Diss. 70 Seiten, 2015

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Idiopathische inflammatorische Myositiden	1
1.2	Tiermodelle zu idiopathischen inflammatorischen Myositiden	5
1.3	Verarbeitung und Präsentation von konventionellen Antigenen	6
1.4	Die Muskelzelle als professionelle Antigen-präsentierende Zelle	7
1.5	Superantigene	9
1.6	Gp120 als Superantigen	11
1.7	Humane endogene Retroviren	13
1.8	Untersuchte Leukozytenantigene	15
1.8.1	CD3	15
1.8.2	CD4	16
1.8.3	CD8	16
2	Zielsetzung der Dissertation	17
3	Material und Methodik	18
3.1	Versuchstiere	18
3.2	Reagenzien	18
3.3	Dosisfindung	19
3.4	Intramuskuläre Injektion des Superantigens	20
3.5	Entnahme und Behandlung des Muskelpräparates	21
3.6	Herstellung der Gefrierschnitte	22
3.7	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	22
3.8	Immunhistochemische Färbung	22
3.9	Modifizierte Gomori-Trichom-Färbung	24
3.10	Positiv- und Negativkontrollen	24
3.11	Methode der Entzündungsbeurteilung	25
3.12	Statistik	26
3.13	Fehlerdiskussion	27

4	Ergebnisse	
4.1	Charakteristik der Entzündung	29
4.2	Beschreibung der Entzündung an Hand der HE-Färbung	33
4.3	Immunhistochemische Färbung: Allgemeine Befunde	37
4.3.1	CD3	37
4.3.2	CD4	37
4.3.3	CD8	37
4.4	Lymphozytensubpopulationen im zeitlichen Verlauf	39
5	Diskussion	
5.1	Allgemeine Überlegungen	41
5.2	Gp120 als Auslöser einer Myositis	41
5.3	Pathogenetische Überlegungen zur gp120-induzierten Myositis	42
5.3.1	Initiierung einer muskulären Entzündung durch gp120	42
5.3.2	CD3-Depression bei der gp120 Myositis	43
5.4	Vergleich der gp120-induzierten Myositis mit der durch ein konventionelles Antigen induzierten Myositis	45
5.5	Vergleich der gp120-induzierten Myositis mit der HIV assoziierten Myositis	48
5.6	Vergleich der gp120-induzierten Myositis bei der Lewis Ratte mit den humanen Krankheitsbildern der Myositiden	49
5.7	Pathogenetische Überlegungen zur Polymyositis	51
5.8	Pathogenetische Überlegungen einer durch humane endogene Retroviren induzierten Myositis als Modell einer Polymyositis	52
5.9	Ausblick	55
6	Zusammenfassung	56
7	Literaturverzeichnis	57
8	Thesen	66
9	Anlagen	68

Tabellarischer Lebenslauf	68
Selbstständigkeitserklärung	69
Erklärung über frühere Promotionsversuche	69
Danksagung	70

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb.1:	Querschnitt durch einen Skelettmuskel (Nach Zierz, 2003).	1
Abb.2:	Die Wirkweise von zytotoxischen T Zellen auf die Zielzelle (Nach Hohlfeld et al., 1997).	4
Abb.3:	Schematische Darstellung der Präsentation von bakteriellen und exogenen (Angelehnt an Hohlfeld et al., 1997).	7
Abb.4:	Aktivierung einer T-Zelle.	8
Abb.5:	Schematische Darstellung der Bindung eines Superantigens mit dem TCR sowie dem MHC-II-Molekül.	10
Abb.6:	Zusammensetzung des menschlichen Genoms in Prozent (modifiziert nach Lander et al., 2001).	13
Abb.7:	Darstellung eines HERV im menschlichen Genom.	14
Abb.8:	Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (modifiziert an Janeway et al., 2001).	15
Abb.9:	HE-Färbungen der Muskelgewebsschnitte nach gp120-Injektion.	20
Abb.10:	Experimentelles Vorgehen der gp120-Superantigen-induzierten Myositis.	21
Abb.11:	Schematische Darstellung der Labeled Avidin-Biotin-Methode (angelehnt an Vorlagen der Firma DAKO).	23
Abb.12:	CD3 Positivkontrolle (a), sowie Negativkontrolle (b), Milzschnitt.	24
Abb.13:	Vorgehen bei der Auszählung der Lymphozyten.	26
Abb.14:	Graphische Darstellung der Ausdehnung der Entzündungsgebiete.	30
Abb.15:	Vergleichende graphische Darstellung der Muskelfaserumfänge zwischen peripheren und entzündungsnahen Muskelfasern nach gp120-Injektion im zeitlichen Verlauf	32
Abb.16:	Tag 1, NaCl.	33
Abb.17:	Tag 1, gp120.	34
Abb.18:	Tag 3, NaCl.	34
Abb.19:	Tag 3, gp120.	35
Abb.20:	Tag 3, gp120.	35
Abb.21:	Tag 10, NaCl.	36

Abb.22:	Tag 10, gp120.	36
Abb.23:	CD8-Färbung, gp120, Tag 3. CD4 Färbung, gp120, Tag 3. CD3 Färbung, gp120, Tag 3.	38
Abb.24:	Übersicht der Lymphozyten im zeitlichen Verlauf.	39
Abb.25:	Beispiele der durch gp120 induzierten Entzündung in den jeweiligen immunhistochemischen Färbungen (CD3,CD4 und CD8) an Tag 3 nach Opferung.	40
Abb.26:	Schematische Darstellung der Retrovirus-Superantigen-Hypothese der Polymyositis.	54
Tab.1:	Histologischer Score nach Matsumoto et al., 2007.	25
Tab.2:	Entzündungsausdehnung bei NaCl- und gp120-Ratten nach dem histologischen Score von Matsumoto et al., 2007.	29
Tab.3:	Übersicht über Modelle zur Induzierung einer Polymyositis.	46
Tab.4:	Vergleich der Muskelbeteiligung von der gp120-induzierten Myositis (aus der vorliegenden Arbeit), der C-Protein induzierten Myositis und der SC2-induzierten Myositis.	47
Tab.5:	Muskelbiopsiebefunde bei gp120-induzierter Myositis (aus der vorliegenden Arbeit) Polymyositis, Dermatomyositis und Einschlusskörperchenmyositis (In Anlehnung an Pongratz und Späth, 2003).	50

Verzeichnis der Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen Präsentierende Zelle
B7	Membran Protein auf APC
BB1	Bombesin receptor 1 (Neuromedin B receptor)
BCR	B-Zell-Rezeptor
B-Zelle	„Bursa“-Zelle
C	Komplementfaktor
C5b6	Bestandteil des Membranangriffskomplexes (MAC)
Ca ²⁺	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementary determining region
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen
CX3CL1	Chemokin der CX3C Familie
D	diversifying
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DM	Dermatomyositis
EBV	Epstein-Barr-Virus
env	envelope (Virushülle)
EMG	Elektromyographie
Fas	Apoptose-Rezeptor-Protein
gag	Gen für gruppenspezifische Antigene
GP	Glykoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HERV	Humanes Endogenes Retrovirus
Histidyl t-RNA	Histidyl Transfer-Ribonukleinsäure
HIV	Humanes Immunodefizienz-Virus
HRS	Histidyl-t-RNA-Synthetase
HV4-Schleife	hypervariable Region 4 der β-Kette des TCR

IBM	Inclusion Body Myositis
Ig	Immunglobulin
IIM	idiopathische inflammatorische Myositiden
IL	Interleukin
ICOS	Inducible costimulator
J	joining
LTR	long terminal repeat
M	mol (Einheit für Stoffmenge)
MAC	Membrane Attack Complex
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
NaCl	Natriumchlorid
PM	Polymyositis
PM-Scl	Polymyositis-Sclerodermie
pol	Gen für Polymerasen
RNA	Ribonukleinsäure
SC2	Protein C Fragment 2
SAG	Superantigen
TAP	Transportproteine assoziiert mit Antigen-Prozessierung
TCR	T-Cell Receptor, T-Zell Rezeptor
T _H	T-Helfer-Zelle
T-Zelle	Thymus-Zelle
V	Variable Region
VH3	Variable Heavy Chain 3

1 Einleitung

1.1 Idiopathische inflammatorische Myositiden

Die Gruppe der idiopathischen inflammatorischen Myositiden (IIM) umfasst nach heutigen Kenntnissen drei Hauptformen: Dermatomyositis (DM), Polymyositis (PM) sowie Einschlusskörperchenmyositis (IBM) (Dalakas, 2011). Diese unterschiedlichen Erkrankungen haben, neben der Entzündung im Skelettmuskel, eine Muskelschwäche gemeinsam. Bisher konnte keine eindeutige Ursache für diese immunogen bedingten Erkrankungen gefunden werden. Allgemein wird ein autoimmunes Geschehen favorisiert (Hohlfeld und Engel, 1994; Greenberg und Amato, 2004; Betteridge et al., 2009). Das Auftreten von Autoantikörpern, lymphozytären Infiltraten und Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen spricht für diese Annahme. Jedoch konnte bisher kein auslösendes Antigen identifiziert werden (Dalakas und Hohlfeld, 2003).

DM, IBM und PM haben gemeinsam (in absteigender Häufigkeit) eine Inzidenz von etwa 1/100.000 (Wiendl, 2008). Es gibt Hinweise auf eine unterschiedliche Inzidenz zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen sowie zwischen geographischen Regionen (Medsger et al., 1970; DeVere und Bradley 1975; Benbassat et al., 1980).

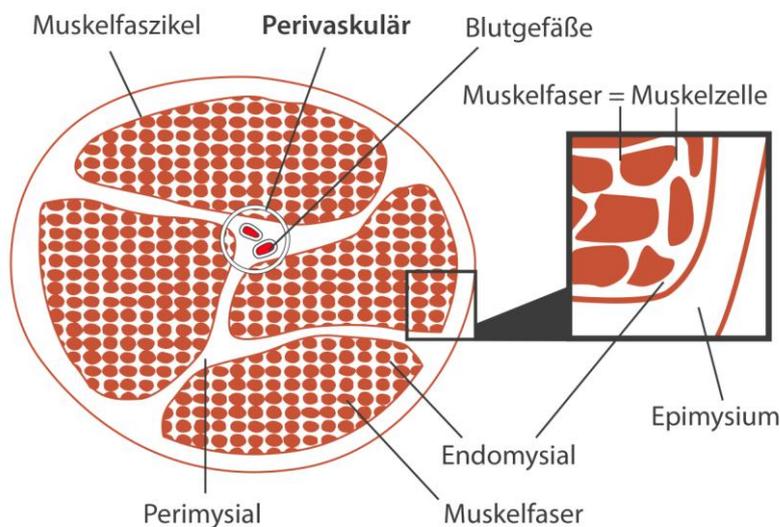


Abb.1: Querschnitt durch einen Skelettmuskel. Darstellung von möglichen Akkumulationszonen von Entzündungszellen (perivaskulär, perimysial und endomysial) (Nach Zierz, 2003).

Nach der gegenwärtigen Vorstellung geht die Dermatomyositis auf einen humoral vermittelten vaskulitischen Prozess zurück. Pathophysiologisch wird angenommen, dass sich Antikörper (Ak) gegen das Endothel von endomysialen Kapillaren bilden. Nach der Aktivierung von Komplement C₃ bildet sich der membrane attack complex (MAC) an endomysialen Kapillargefäßen (Kissel et al., 1986). Dies führt zu einer osmotischen Lyse der endothelialen Zellen und somit zu einer kapillären Nekrose. Durch die darauf folgende Ischämie der im kapillären Stromgebiet liegenden Muskelzellen kommt es zur Inflammation mit perifaszikulärer Atrophie (Dalakas, 2001). Bei einer Ischämie kommt es zur Ausschüttung von Chemokinen, Zytokinen und Interleukinen, welche eine Inflammation induzieren (Eltzschig und Eckle, 2011).

Die Erkrankung kommt bei Kindern wie bei Erwachsenen vor, wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer (Dalakas und Holfeld, 2003). Es besteht eine Assoziation der DM mit Tumoren sowie mit anderen Autoimmunerkrankungen (Greenberg und Amato, 2004). Die DM kommt weiter bei sogenannten Overlap-Syndromen vor. Bei dieser Antikörper-assoziierten Gruppe von Erkrankungen zeigt sich ein Überlappen klinischer Symptome von mindestens zwei Autoimmunerkrankungen (Dalakas und Holfeld, 2003). Klinisch zeigt sich eine proximale Parese, die jedoch nur bei circa 50% der Fälle klinisch in Erscheinung tritt (Bohan und Peter, 1975a; DeVere und Bradley 1975). Typisch für die DM sind ferner fliederfarbene Erytheme, welche insbesondere im Gesichtsbereich zu beobachten sind sowie ödematöse Schwellungen im Bereich der Augenlider, Wangen und des Hals-Brustbereiches. Des Weiteren finden sich erythematöse Papeln über den Fingergelenken (Gottron-Zeichen) sowie Teleangieektasien im Bereich der Nagelbetten (Keinig-Zeichen) (Santmyire-Rosenberger und Dugan, 2003). Bei der DM sind teilweise Manifestationen außerhalb der Skelettmuskulatur zu finden. Die häufigste Beteiligung ist dabei kardial, etwa atrioventrikuläre Leitungsstörungen, oder pulmonal, z.B. Lungenfibrosen (Lundberg, 2006; Fathi et al., 2008). Paraklinisch treten eine Erhöhung der Kreatininkinase im Blutserum sowie hohe Antikörpertiter in Erscheinung (Betteridge et al., 2009; Stuhlmüller et al., 2013). Assoziierte Antikörper sind unter anderem gegen folgende Antigene gerichtet: Mi2, PM-Scl und Ku (Ghirardello et al., 2013). In der Elektromyographie (EMG) zeigt sich pathologische Spontanaktivität mit Fibrillationen und positiven scharfen Wellen (Bohan und Peter, 1975b). Histopathologisch kommt es zur perifaszikulären und perivaskulären Entzündung mit Hochregulierung des Major Histocompatibility Complex (MHC)-I auf den Muskelzellen (Wiendl et al., 2005). Darüber hinaus werden Muskelfasernekrosen beobachtet. Die atrophen Muskelfasern sind gruppenweise angeordnet. Das zelluläre Bild der DM ist von B-Zellen sowie CD4⁺-Lymphozyten geprägt (Aleksza, 2005). Charakteristisch sind

ferner C5b9-Komplementablagerungen im Bereich der kleinen Arteriolen und Kapillaren (Dalakas, 2011).

Die Einschlusskörperchenmyositis (IBM) ist eine chronisch entzündliche und degenerative Erkrankung. Es wird zwischen sporadischer und hereditärer IBM unterschieden. Die hereditäre Form kann sowohl dominant als auch rezessiv vererbt werden. Eine Anhäufung von Proteinfibrillen wird als pathogenetischer Faktor diskutiert (Greenberg, 2009). Diese sollen einen degenerativen Prozess induzieren. Als Auslöser wird ein Zusammentreffen von oxidativem Stress, Amyloidablagerungen und Signaltransduktionsstörungen vermutet, so dass es eventuell sekundär zu einer Entzündungsreaktion kommt (Dalakas, 2006). Die IBM tritt insbesondere nach dem fünfzigstem Lebensjahr in Erscheinung, wobei Männer häufiger als Frauen betroffen sind (Dalakas, 1991). Klinisch zeigen sich langsam progrediente Paresen. Als Besonderheit bei der IBM gegenüber den anderen inflammatorischen Myositiden (DM, PM) ist auffällig, dass Paresen oft auch distal, etwa in den Fingerflexoren, vorkommen (Dalakas, 1991). Histopathologisch überwiegt eine zelluläre, von CD8⁺-Lymphozyten dominierte Immunantwort mit endomysialen lymphozytären Ansammlungen (Stuhlmüller et al., 2013). Es finden sich Vakuolen mit eosinophilen Einschlüssen. Die Vakuolen haben einen basophilen Randsaum und werden als Rimmed Vacuoles bezeichnet (Dalakas, 2006). Weiterhin finden sich ausgeprägte Kaliberschwankungen zwischen den Muskelfasern. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen von IBM-Patienten fanden sich intrazytoplasmatische Mikrotubuli und im Bereich der Vakuolen intraplasmatische Degenerationsprodukte wie Glykogen (Beyenburg et al., 1993; Molnar und Schröder, 1998).

Die Polymyositis stellt eine durch CD8⁺-Lymphozyten dominierte Entzündung dar, welche sich gegen MHC-I-exprimierende Muskelzellen richtet (Arahata und Engel 1984). Die Erkrankung betrifft überwiegend erwachsene Patienten, kommt jedoch bei stringenter Berücksichtigung der histologischen Kriterien ausgesprochen selten vor (van der Meulen et al., 2003). Klinisch äußert sich die PM in proximaler Muskelschwäche, Druckschmerz und Muskelatrophie. Die Symptome sind über Wochen bis Monate progredient. Paraklinisch findet sich eine um das 5- bis 50fache erhöhte Kreatininkinase im Blutserum (Stuhlmüller et al., 2013). Histopathologisch sind CD8⁺-Lymphozyten zu sehen, welche in nicht atrophische MHC-I-exprimierende Muskelfasern invadieren. In der Elektronenmikroskopie sind Rundzellen mit spikeähnlichen Fortsätzen auszumachen, die in die Muskelfaser eindringen. Die entsprechenden Lymphozyten konnten als suppressorische- und zytotoxische T-Zellen identifiziert werden (Arahata und Engel, 1986). Die Zytotoxizität der CD8-positiven Zellen beruht auf einer Sekretion von Perforin und Granzym und auf einer Interaktion des Apoptose-Rezeptor-Protein (Fas)-Liganden der

zytotoxischen T-Zelle mit dem Fas-Molekül auf der Zielzelle, welche die Zielzelle in die Apoptose treibt (Mantegazza et al., 1993; Goebels et al., 1996).

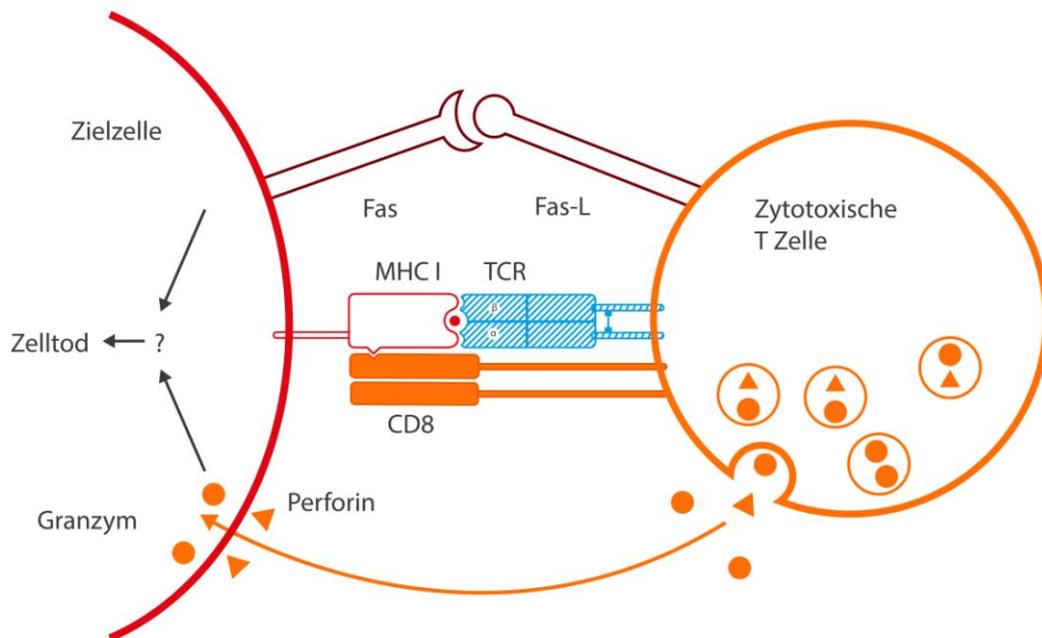


Abb.2: Die Wirkweise von zytotoxischen T-Zellen auf die Zielzelle: Zwei Wege führen zum Zelltod der Zielzelle: Sekretion von Perforin und Granzym durch die zytotoxische T-Zelle, nachdem der Antigen-MHC-I-Komplex erkannt wurde oder durch eine Interaktion des Fas-Liganden der zytotoxischen T-Zelle mit dem Fas-Molekül auf der Zielzelle, welche die Zielzelle in die Apoptose treibt (Nach Hohlfeld et al., 1997). (CD: Cluster of Differentiation, Fas: Apoptose-Rezeptor-Protein, Fas-L: Fas-Ligand, MHC: Major Histocompatibility Complex, TCR: T-Zell-Rezeptor).

Die lymphozytären Ansammlungen haben oft nodulären Charakter und sind endomysial gelegen (Salajegheh et al., 2010). Neben den zytotoxischen T-Zellen zeigen sich endomysiale Makrophagen. Die Pathogenese der Polymyositis ist bislang ungeklärt. Es kommt zu einer klonalen T-Zell-Expansion mit nur bestimmten variablen T-Zell-Rezeptor (TCR) Regionen. Dies wurde als Hinweis für eine Antigen-spezifische Immunantwort gedeutet (Bender et al., 1995).

1.2 Tiermodelle zu idiopathisch inflammatorischen Myositiden

In den letzten Jahren konnten einige vielversprechende Modelle für die idiopathischen inflammatorischen Myositiden (IIM) entwickelt werden. Nach wie vor ist allerdings kein Tiermodell in der Lage, den vollen Umfang der entsprechenden idiopathischen inflammatorischen Erkrankungen des Menschen abzubilden. Im Folgenden werden solche Modelle einbezogen, die durch konventionelle Antigene ausgelöst wurden und daher am Ehesten mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit vergleichbar sind.

Die Gruppe um Kojima induzierte eine experimentelle autoimmune Myositis durch Myosin. Diese Myositis zeigte insgesamt ein mildes Bild einer Inflammation (Kojima et al., 1997). Kohyama und Matsumoto verfolgten diesen Weg weiter und erreichten mit der Injektion von Protein C eine deutlich stärker ausgeprägte Inflammation. Bei der Protein-C-induzierten experimentellen autoimmunen Myositis zeigten sich nicht atrophische Muskelfasern, welche von CD8⁺ Zellen invadiert wurden. Des Weiteren sind CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen vorwiegend im Endomysium anzutreffen. Diese Merkmale weisen auf eine Polymyositis hin. Die Autoren schlussfolgerten, dass durch Protein C eine Polymyositis induzieren werden kann (Kohyama und Matsumoto, 1999).

Aufbauend auf diese Ergebnisse zeigten Matsumoto et al., dass eine ähnlich schwere Myositis nach Injektion von menschlichen Protein-C-Fragmenten zur Darstellung kommen kann. Die stärksten Effekte hat die Injektion von skelettalem Protein-C-Fragment 2. Auch in diesem Fall weist die Entzündung Merkmale einer Polymyositis auf. Die Lymphozytenansammlungen sind endomysial gelegen. Es konnten insbesondere CD4⁺ sowie CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden. Prozentual infiltrierten vor allem CD8⁺-T-Zellen die Muskelzellen. Es wurde angenommen, dass die C-Protein induzierte Myositis sowohl aus der Aktivierung von gegen Protein C gerichteten T-Zellen, als auch aus der spezifischen Antikörperproduktion gegen dieses Antigen resultiert (Matsumoto et al., 2007). In den vorgestellten Modellen von Kohyama und Matsumoto wurden Lewis Ratten einer vier- beziehungsweise dreimaligen intramuskulären Injektion des jeweiligen Antigens unterzogen. Die Ergebnisse wurden durch Sugihara et al. mit einer Einmalinjektion von rekombinantem menschlichen C-Protein in Mäusen bestätigt (Katsumata und Ascherman, 2008). In ähnlicher Weise hat die Gruppe um Benveniste ein vergleichbares Modell für eine Polymyositis an Mäusen durch mehrfache intramuskuläre Injektion von Myosin entwickelt (Allenbach et al., 2009).

Um die Pathogenese der idiopathischen inflammatorischen Myositiden weiter zu untersuchen, examinierten Katsumata et al. die Rolle der induzierbaren kostimulatorischen Rezeptoren (ICOS). Die ICOS wurden auf den Muskel-invadierenden T-Zellen gefunden (Katsumata et al.,

2007a). Die ICOS agieren mit ihren Liganden (ICOSL), welche bei einer Inflammation auf Muskelzellen exprimiert werden und zur Antigenpräsentation dienen (Windl et al., 2003). Hierzu behandelten die Autoren Ratten, welche eine Protein-C-induzierte Myositis aufwiesen, mit monoklonalen anti-ICOS Antikörpern. Es kam zu einem Abfall der Muskel-invadierenden CD8⁺-T-Zellen, der Inzidenz einer Myositis und zu einem Rückgang der Intensität der Myositis (Katsumata et al., 2007a).

Ein weiterer Ansatz, eine experimentelle autoimmune Myositis auszulösen, gelang Nakano et al.. Dabei wurde Laminin als Antigen eingesetzt (Nakano et al., 2005).

Die Immunisierung mit muriner Histidyl-tRNA-Synthetase (HRS) gilt als erstes Modell, das neben den idiopathischen inflammatorischen Myositiden auch extramuskuläre Aspekte beleuchtet. Gegen die Histidyl-tRNA-Synthetase bilden sich Ak, welche in der Pathogenese des Antisynthetase Syndroms (Jo1-Syndrom), in dem Muskelentzündung mit intestinalen Lungenerkrankungen auftreten, eine Rolle zu spielen scheinen (Mahler et al., 2014). Nach Immunisierung von Mäusen mit HRS kommt es zu einer Kombination von Muskel- und Lungenentzündung. Dieses Modell ist besonders interessant, da es nicht nur die Muskelreaktion auf ein bekanntes Antigen, sondern auch eine dem humanen Krankheitsbild ähnliche Multiorganerkrankung beschreibt (Katsumata et al., 2007b).

1.3 Verarbeitung und Präsentation von „konventionellen“ Antigenen

Bruchstücke „konventioneller“ Antigene werden ganz überwiegend von MHC Klasse I an der Zelloberfläche exprimiert. Exogene und bakterielle Antigene werden von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und durch Proteasen in Peptide verdaut. Diese binden in Fusionsvesikeln an MHC-II-Molekülen, die im endoplasmatischem Retikulum gebildet werden (Pieters, 2000). Als MHC-Peptid-Komplex wird die Verbindung an die Zellmembran transportiert und kann dort CD4⁺-Zellen aktivieren und zur Proliferation und Sekretion von Zytokinen führen (Goldrath und Bevan, 1999).

Körpereigene und virale Proteine werden im Zytoplasma synthetisiert. Durch Proteasomen werden diese endogenen Antigene in kleine Peptide gespalten und von Transportmolekülen (TAP) ins endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sie an MHC-I-Moleküle binden (Lankat-Buttgereit und Tampe, 1999). Über den Golgi-Apparat wird der MHC-Peptid-Komplex an die Zelloberfläche transportiert. Hier interagiert er mit CD8⁺-Zellen, welche durch Sekretion von lytischen Enzymen (Granzym, Perforin) Peptid-exprimierende Zellen lysieren können (Goebels et al., 1996). Für die spezifische Interaktion des präsentierten Peptids mit dem TCR

müssen die Sequenzen der α - und β -Kette stimmen, um das Antigen in der Peptidbindungsstelle zu binden (Davis et al., 1998).

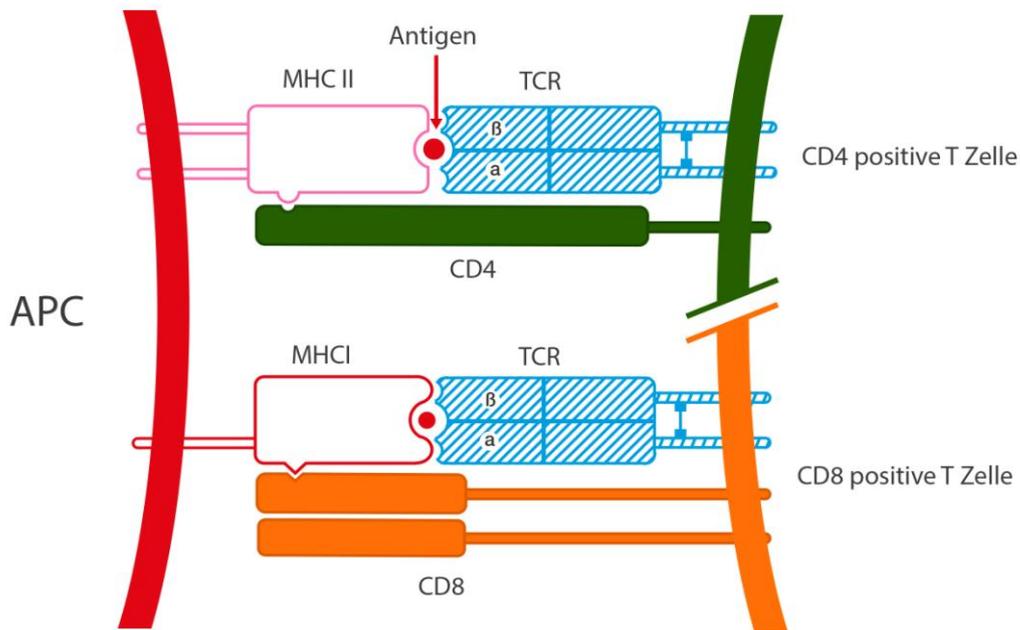


Abb.3: Schematische Darstellung der Präsentation von bakteriellen und exogenen Antigenen über MHC-II an $CD4^+$ -Zellen sowie der Präsentation von intrazellulären (körpereigenen oder viralen) Bestandteilen über MHC-I-Moleküle an $CD8^+$ -Zellen (angelehnt an Holfeld et al., 1997). (CD: Cluster of Differentiation, MHC: Major Histocompatibility Complex, TCR: T-Zell-Rezeptor).

1.4 Die Muskelzelle als Antigen-präsentierende Zelle

Muskelzellen nehmen eine aktive Rolle im immunologischen Geschehen ein und agieren unter anderem als Antigen-präsentierende Zellen, welche eine Immunantwort hervorrufen können. (Murata und Dalakas, 1999). Unter physiologischen Umständen ohne Inflamationsreiz exprimieren Muskelzellen keine messbaren Mengen an MHC-II. Erst nach Aktivierung, zum Beispiel durch ein externes Antigen, ist der Muskel in der Lage MHC-II zu produzieren (Wiendl et al., 2003a).

Dementsprechend exprimieren Muskelzellen bei Inflammation neben MHC-I auch MHC-II und sind in der Lage, alle Arten von Antigenen zu präsentieren (Dalakas und Holfeld, 2003). Mit Hilfe von weiteren kostimulatorischen Molekülen der B7-Familie (B7-1 (CD80), B7-2 (CD86)) auf den Muskelzellen und dazugehörigen Rezeptoren auf den $CD8^+$ -T-Zellen (CD28, CTLA4, ICOS) kommt es zu einer direkten Aktivierung der $CD8^+$ -T-Zellen (Behrens et al., 1998; Waschbisch et al., 2008). Dabei ist für die Aktivierung der T-Zelle die kostimulatorische Interaktion von elementarer Bedeutung. Das erste Signal (die Bindung des T-Zell-Rezeptors mit

dem Antigen-MHC-Komplex) ist dabei die spezifische Bindung. Zur Aktivierung benötigt die T-Zelle jedoch noch ein zweites, unspezifisches Signal (Lafferty und Woolnought, 1977). Dieses Signal ist die Bindung von Molekülen der B7-Familie auf der APC mit einem entsprechenden Rezeptor (CD28, CTLA4, ICOS) (Wiendl et al., 2003b).

Die APC, in diesem Fall die Muskelzelle, exprimiert nach der Präsentation des Antigens (Ag) über den MHC-Komplex die kostimulatorischen Moleküle der B7-Familie. B7-1 bzw. B7-2 binden an den Korezeptor CD28 auf der T-Zelle und setzen so die zweite Signalkaskade in Gang. Erst dann kann eine Proliferation und Zytokinsekretion von der T-Zelle erfolgen.

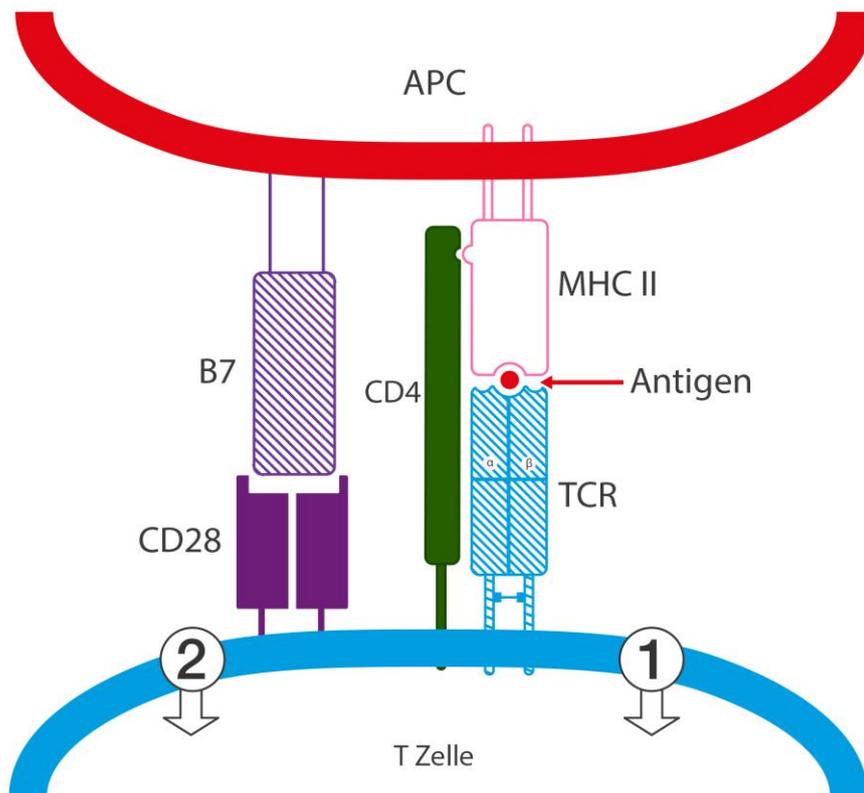


Abb.4: Aktivierung einer T-Zelle durch 2 Signale: Eine Aktivierung der T-Zelle (mit Proliferation und Zytokinsekretion) erfolgt nach Bindung des Antigen-MHC-Komplexes an den TCR (Signal 1) und der Interaktion von kostimulatorischen Molekülen, im abgebildeten Fall von B7 mit CD28 (Signal 2). (APC: Antigen präsentierende Zelle, B7: Membranprotein auf APC, CD: Cluster of Differentiation, MHC: Major Histocompatibility Complex, TCR: T-Zell-Rezeptor).

Als weiteres kostimulatorisches Molekül der B7-Familie wurde ICOS-L (inducible co-stimulator ligand) beschrieben. Er agiert mit seinem Rezeptor (ICOS), welcher auf aktivierten T-Zellen vorkommt und so diese Zellen kostimuliert (Wiendl et al., 2003b). Des Weiteren wurden als

kostimulatorische Moleküle das B7-Homolog B7-H1 und BB1 gefunden. (Behrens et al., 1998; Wiendl et al., 2005).

Die Muskelzelle agiert demzufolge selbst als professionelle Antigen-präsentierende Zelle und kann so T-Zellen aktivieren.

1.5 Superantigene

Erstmals wurden Superantigene (SAG) in den frühen 1970er Jahren von Festenstein beschrieben (Festenstein, 1973; Festenstein und Kimura, 1988). Vorerst wurde angenommen, dass Superantigene überwiegend bakterielle Produkte wie zum Beispiel Staphylokokken Enterotoxine sind (Amariglio und Rechavi, 1996). Durch neue Erkenntnisse ist die Gruppe der Superantigene jedoch gewachsen. Es werden Mitogene bakteriellen und viralen Ursprungs als Superantigene bezeichnet. Auch wird die alleinige Wirkung einer reinen Aktivierung von T-Zell-Populationen dem Superantigen nicht gerecht, da auch B-Zell-stimulierende Superantigene identifiziert wurden (Berberian et al., 1993; Amariglio und Rechavi, 1996).

T-Zell-Superantigene sind Antigene, welche in der Lage sind, eine Vielzahl an T-Zell-Populationen zu aktivieren. Während konventionelle Antigene nur etwa $1:10^4$ bis $1:10^6$ T-Zellen aktivieren können, findet bei Superantigenkontakt eine T-Zell-Aktivierung von bis zu 20% statt (Herman et al., 1991). Dabei kommt es zu einer „neuartigen“ Präsentation des Antigens.

Während „konventionelle“ Antigene von einer APC aufgenommen und prozessiert werden oder in einer Zelle synthetisiert werden und dann gemeinsam mit dem MHC-Molekül an der Zelloberfläche präsentiert werden, wird dieser Schritt von dem Superantigen übergangen. Superantigene binden direkt, ohne intrazelluläre Prozessierung, an eine Stelle des MHC-Moleküls, welche außerhalb der herkömmlichen Peptidbindungsstelle liegt. Dabei bindet es direkt und einzig an die V β -Untereinheit des TCR oder an einer Stelle des B-Zell-Rezeptors (BCR = CD79 + Immunglobulin), sodass nur hier eine Übereinstimmung des Superantigens mit dieser variablen Untereinheit erforderlich ist (Berberian et al., 1993; Fields et al., 1996; Torres et al., 2001).

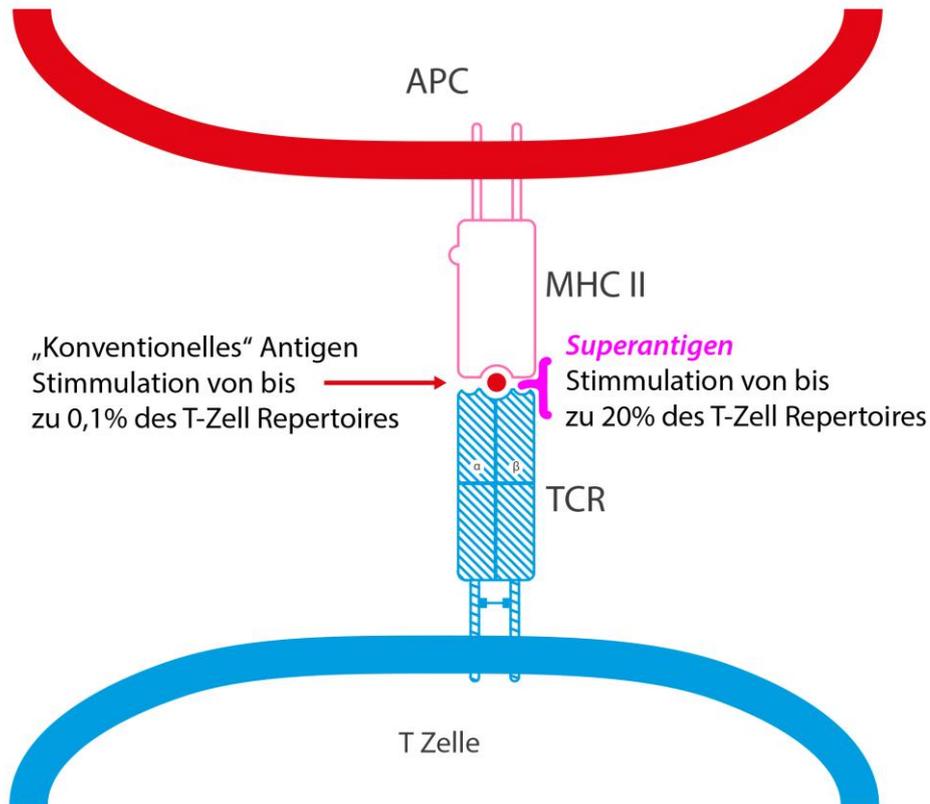


Abb.5: Schematische Darstellung der Bindung eines SAG mit dem TCR sowie dem MHC-II-Molekül. Das SAG bindet an der $V\beta$ -Untereinheit des TCR und am MHC-Molekül außerhalb der Peptidbindungszone (APC: Antigen präsentierende Zelle, MHC: Major Histocompatibility Complex, TCR: T-Zell-Rezeptor).

Die biologische Aktivität eines Superantigens beruht darauf, dass es als intaktes Protein an die Oberfläche eines bereits peptid-beladenen MHC-Moleküls bindet. Die Bindung des Superantigens an die $V\beta$ -Untereinheit des TCR ist spezifisch für Produkte des $V\beta$ -Gensegmentes. Der Mensch besitzt davon etwa 20 bis 50 (Fields et al., 1996). Bakterielle T-Zell-Superantigene binden hauptsächlich an die $V\beta$ -CDR2-Schleife, während virale T-Zell-Superantigene bevorzugt an die HV4-Schleife (Bestandteile der $V\beta$ -Untereinheit) binden. Für die Erkennung eines Superantigens haben die α -Kette und die CD3-Region des TCR wohl keinen Einfluss (Fields et al., 1996). Nach der Stimulation durch ein Superantigen kommt es zur massiven Proliferation spezifischer T-Zellen und zur Produktion von Zytokinen (Herman et al., 1991; Fields et al., 1996). Auch B-Zell-Superantigene binden nicht an der klassischen Antigenbindungsstelle, sondern selektiv an die variable schwere Kette (V_H) von Antikörpern, die als Teil des B-Zell-Rezeptors auf B-Zellen exprimiert sind (Zoulai, 2007).

Neben und nach der Stimulation von Lymphozyten durch Superantigen sind auch Effekte wie Anergie und Deletion auf T-Zellen bekannt (Kawabe und Ochi 1990, Gougeon et al., 1993, Torres et al., 2001). Entsprechend beschreiben Torres et al. eine Anergie oder Depression von naiven T-Zellen nach Superantigenkontakt (Torres et al., 2002). Bei Patienten, welche mit dem Humanen Immunodefizienz-Virus (HIV) infiziert sind, ist nach einer initialen Aktivierung von B-Zellen eine anschließende Anergie und Deletion dieser Zellen zu verzeichnen (Townesley-Fuchs et al., 1997). Damle et al. bemerkten, dass einige T-Zell-Population nach SAG-Kontakt selektiv zerstört werden. Bei überlebenden T-Zellen scheint der TCR/CD3-Komplex herunter reguliert zu sein. (Damle et al., 1993; Page et al., 2004). Diese selektive Abnahme von CD3-markierten Zellen zeigte sich auch bei Superantigen-induzierter Enzephalitis und wurde als direkte Reaktion auf das injizierte Superantigen gewertet (Emmer et al., 2010). In Mausexperimenten konnte eine negative Selektion von T-Zell-Rezeptoren mit bestimmten V β -Segmenten entdeckt werden. Hier werden endogene Superantigene von Mäusen, sogenannte mouse mammary tumor viruses (MMTV), teils auch als minor lymphocyte-stimulating antigens bezeichnet, verantwortlich gemacht. Diese Antigene werden von Retroviren kodiert, welche sich stabil in die Mauschromosomen integriert haben. Durch MMTV-Antigene lässt sich sowohl eine starke T-Zell Antwort als auch eine selektive Apoptose von bestimmten T-Zellen im Thymus, welche MMTV-Proteine binden, auslösen (Acha-Orbea et al., 1999).

Nach einem Superantigenkontakt kann es also paradoxerweise nach einer initialen massiven Aktivierung zu einer Anergie und Deletion der zuvor proliferierenden Zellen kommen (Kawabe und Ochi 1990, Berberian et al., 1993; Gougeon et al., 1993, Torres et al., 2001).

1.6 Gp120 als Superantigen

Gp120 ist ein Glykoprotein (gp) und ein Hüllbestandteil des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV). Die gp120-Sequenz besteht aus fünf variablen sowie fünf konservierten Regionen. Auf einem diskontinuierlichen Epitop befindet sich die CD4-Bindungsstelle (Townesley-Fuchs et al., 1997). Durch diese Bindung wird der Kontakt zu den Leukozyten hergestellt und das HIV internalisiert (Chirmule et al., 1988).

Bei HIV-infizierten Patienten kommt es zu einer selektiven Reduktion von CD4⁺ T-Zellen und von B-Zellen. Als eine Ursache für dieses Phänomen wurde eine Superantigen-vermittelte Deletion diskutiert (Berberian et al., 1993). B-Zell-Superantigene binden selektiv an die variable schwere Kette (V_H) von Antikörpern und lösen über diese Bindung eine Aktivierung der entsprechenden B-Zellen aus (Zoulai, 2007). Gp120 weist eine Spezifität für die V_H3-Familie auf

und kann direkt an V_H3 -Ig binden (Berberian et al., 1993). In Beobachtungen von uninfizierten B-Zellen konnte festgestellt werden, dass 2-6 % der B-Zellen gp120 gebunden hatten. Demgegenüber beträgt die Bindungsrate von B-Zellen an konventionellen Antigenen nur etwa 0,01% (Berberian et al., 1993). In frühen Stadien nach HIV-Infektion wird eine oligoklonale Proliferation von V_H3 -B-Zellen und Antikörperproduktion nachgewiesen. Dies kann als ein starker Hinweis auf eine B-Zell-Superantigeneigenschaft des gp120 gewertet werden (Berberian et al., 1994).

Bisher wird gp120 insbesondere als B-Zell-Superantigen aufgefasst. Jedoch vermutet Zouali, dass gp120 auch T-Zellen beeinflusst (Zouali, 2007). Es konnte eine oligoklonale Expansion von T-Zellen mit bestimmten V-Genen in der akuten Infektionsphase mit HIV festgestellt werden (Laurence et al., 1992; Gougeon et al., 1993). Da die Veränderung des T-Zell-Rezeptors nicht nur CD4-positive Zellen betrifft, an welchem gp120 nachweislich bindet, sondern auch bei CD8-positiven Zellen der TCR verändert ist, ist ein selektiver Effekt an der V-Region von CD4⁺-Zellen als Einzelmechanismus unwahrscheinlich (Müller und Köhler, 1997).

Jason et al. stellten weiterführend fest, dass gp120 $V\beta$ 8.1, 13.1/3 beeinflusst. Die Herunterregulierung dieser Gene führt zu einer CD4-Depression, während $V\beta$ 21.3 überexprimiert wird, welches eine CD8-Expansion bewirkt (Jason et al., 1997). Diese CD8⁺-Expansion konnte auch in frühen Stadien der HIV-Infektion gefunden werden (Pantaleo et al., 1994; Amariglio und Rechavi, 1996).

1.7 Humane endogene Retroviren

Retroviren besitzen einsträngige RNA, welche durch reverse Transkriptase in doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA) umgeschrieben und in das Genom des Wirtes integriert wird (Varmus, 1988). Die Hauptbestandteile eines Retrovirus sind: gag (welches für gruppenspezifische Antigene verschlüsselt), pol (für Polymerasen, welche als Genprodukt die reverse Transkriptase, die Protease und Integrase beinhaltet) und env (kodiert die Virushülle) (Varmus, 1988).

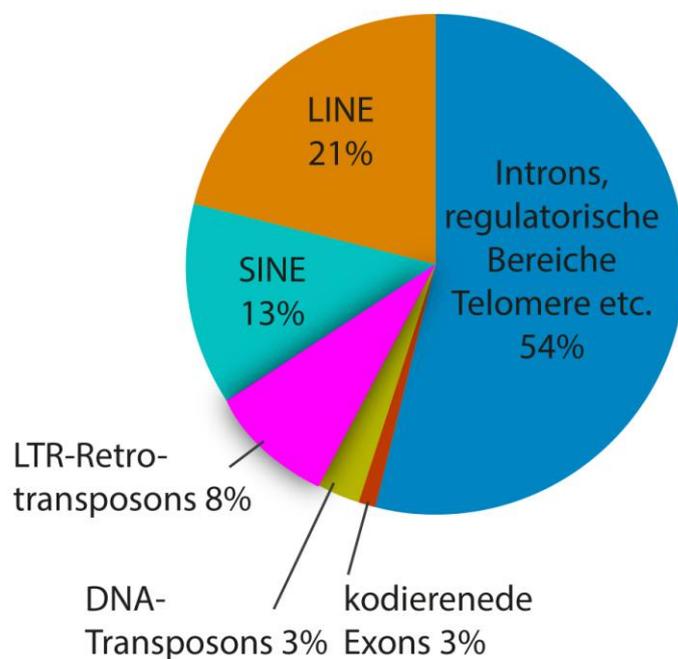


Abb.6: Zusammensetzung des menschlichen Genoms in Prozent (modifiziert nach Lander et al., 2001). (DNA: Desoxyribonukleinsäure, LINE: long interspersed elements, LTR: long terminal repeat, SINE: short interspersed elements)

Die Gruppe der LTR-Retrotransposons macht etwa 8% des menschlichen Genoms aus und umfasst endogene Retroviren und Retrovirus-ähnliche Elemente (Lander et al., 2001). Es wird angenommen, dass endogene Retroviren durch eine exogene Infektion der Keimzellen entstehen. Diese integrierte Virus-DNA wird dann als Teil des Wirtsgenoms von Generation zu Generation weitervererbt und verlieren durch Mutationen ihre Replikationskompetenz (Sverdlov, 2000).

Die Expression von Superantigenen konnte für endogene und exogene Retroviren gezeigt werden (Huber et al., 1996; Sutkowski et al., 2001; Meylan et al., 2005). Dabei scheint das envelope-Segment bei humanen endogenen Retroviren (HERV) u.a. für Superantigene zu

kodieren (Stauffer et al., 2001; Turcanova et al., 2009). Um die Superantigene exprimieren zu können müssen die inaktiven HERVs erst transaktiviert werden. Eine Transaktivierung findet durch exogene Viren wie dem Epstein-Barr Virus statt (Sutkowski et al., 2001). Das Phänomen der Transaktivierung wurde bereits in mehreren Studien nachvollzogen (Nellaker et al., 2006; Palù et al., 2001; Lee et al., 2003). Der Grund für die unterschiedlichen Transkriptionslevel der HERVs in den unterschiedlichen Organen wird durch eine Varianz der Aktivitäten der Promotor-Regionen erklärt (Schön et al., 2001).



Abb.7: Darstellung eines HERV im menschlichen Genom. Aus dem Segment der Virushülle (envelope) kann nach Transaktivierung (zum Beispiel durch EBV) ein Superantigen entstehen. (DNA: Desoxyribonukleinsäure, Env: envelope, Gag: Gen für Gruppenspezifische Antigene, LTR: long terminal repeat, Pol: Gen für Polymerasen)

1.8 Untersuchte Leukozytenantigene

1.8.1 CD3

Das CD3-Antigen ist mit dem Antigenrezeptor von T-Zellen assoziiert. Es ist ein Bestandteil der Zelloberflächenexpression und notwendig für die Signalübertragung des TCR. Eine Aktivierung von T-Zellen ist mit Hilfe des CD3-Moleküls möglich (Klausner und Samelson, 1991; Call et al., 2002). Die Signaltransduktion geschieht nach der Bildung eines MHC-Antigen-TCR-Komplexes. Der CD3-TCR-Komplex besteht aus α : β - oder γ : δ - T-Rezeptorketten und den unveränderlichen Untereinheiten $\text{CD3}\gamma$, δ und ϵ , sowie den dimeren ζ - Ketten (Göbel und Bolliger, 2000). Die Signalübertragung findet mit Hilfe der transmembranen Polypeptidketten ($\text{CD3}\epsilon$, $\text{CD3}\delta$ und $\text{CD3}\gamma$) und dem Homodimer aus ζ -Ketten statt. Das Signal der Rezeptorstimulation wird über Tyrosinkinasen weitergeleitet. Dadurch wird ein Gen aktiviert. Das CD3-Molekül befindet sich sowohl auf allen T-Zellen als auch auf Thymozyten (Malissen et al., 1999).

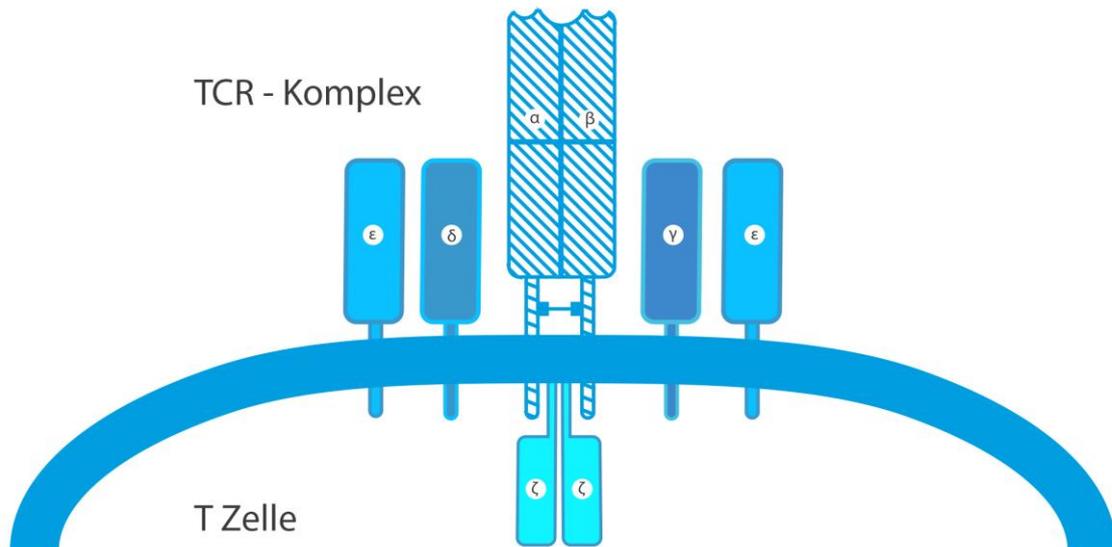


Abb.8: Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptor-Komplexes bestehend aus dem T-Zell-Rezeptor (alpha/beta- oder gamma/delta-Kette), des Differenzierungsmerkmals CD3 (einer gamma-Kette, einer delta-Kette und zwei epsilon-Ketten) und den Zeta-Ketten (angelehnt an Janeway et al., 2001). (CD: Cluster of Differentiation, TCR: T-Zell-Rezeptor).

1.8.2 CD4

Das CD4-Antigen fungiert als Korezeptor für MHC-II-Moleküle. Es ist ein monomorphes Glykoprotein von 56kD und weist Homologien zur Grundstruktur der Immunglobuline auf. Es besteht aus vier extrazellulären Domänen und wird sowohl von T_H1-, als auch von T_H2- Zellen exprimiert (Wu et al., 1997). Diese machen etwa zwei Drittel der peripheren T-Zellen aus. Des Weiteren tragen Monozyten, Makrophagen und einige Thymozyten das Antigen auf ihrer Zelloberfläche. Der Ligand für CD4 ist MHC-II (Zamoyska, 1998). Eine Interaktion erfolgt bei Antigenpräsentation von MHC-II und einer Erkennung des Antigens durch den TCR. Über diesen Mechanismus werden extrazelluläre Bestandteile den T-Zellen präsentiert (Kronenberg et al., 1986; Holländer et al., 2006).

1.8.3 CD8

CD8 besitzt eine den Immunglobulinen verwandte Struktur und ist ein monomorphes Glykoprotein. Das CD8-Glykoprotein besteht aus einer α - und einer β -Kette und wird an der Zelloberfläche von zytotoxischen T-Zellen exprimiert, welche etwa ein Drittel der peripheren T-Zellen ausmachen (Gao et al., 1997). Des Weiteren befindet sich das Antigen auf einigen Thymocyten. Als Co-Rezeptor für MHC-I-Moleküle hat das CD8-Antigen für die Erkennung von Antigenen, welche in einer Zelle synthetisiert werden, eine tragende Rolle. Dies spielt insbesondere bei Virusinfektionen eine Rolle. Die im endoplasmatischen Retikulum an MHC-I-Molekülen gebundenen Peptide, werden durch CD8-positive Zellen erkannt und es erfolgt eine Signaltransduktion über CD8 α (Zamoyska, 1997).

2 Zielstellung der Studie

Wie bereits dargelegt, stellt gp120 ein Superantigen dar, das sowohl stimulatorisch als auch suppressorisch beziehungsweise anergisierend auf das Immunsystem einwirken kann. Bislang gibt es kaum Arbeiten, die eine Wirkung von gp120 in einem einzelnen Organ zum Gegenstand haben. Bei einer HIV-Infektion kann es unter anderem zu einer Myositis kommen (Johnson et al., 2003). Die Pathogenese dieser Myositis ist aktuell ungeklärt. Es liegt allerdings nahe, dass gp120 dabei eine Rolle spielen könnte. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Reaktion auf eine intramuskuläre Injektion von gp120 zu charakterisieren. Es soll auf Eigenschaften einer eventuell durch gp120-induzierten Entzündung eingegangen werden und versucht werden, Rückschlüsse auf die HIV-Myositis oder auf andere Myositiden zu ziehen. Das durch gp120 gegebenenfalls hervorgerufene Rundzellinfiltrat soll ebenfalls auf das Vorhandensein und die Verteilung der Lymphozytenantigene CD3, CD4 sowie CD8 untersucht werden. Folgende Fragen sind durch diese Arbeit zu klären:

- Verursacht die Injektion des viralen Superantigens gp120 eine Entzündung im Skelettmuskel (am Beispiel der Ratte)?
- Wie ist der Charakter der Entzündung?
- Ähneln die Entzündung gegebenenfalls einer bereits bekannten Art der Myositis?
- Können die Ergebnisse in einen pathogenetischen Zusammenhang gesetzt werden?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die durchgeführte experimentelle Arbeit wurden 21 Ratten eingesetzt. Davon wurden 13 mit dem Superantigen gp120 behandelt und 8 mit Lösungsmittel (NaCl). Zusätzlich wurden für den Pilotversuch zur Dosisfindung noch 6 weitere Ratten verwendet. Es handelt sich bei allen Ratten um männliche circa 300 g schwere Lewis-Inzuchtratten der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Die Ratten wurden unter Standardbedingungen (klimatisierte Räume, 12h:12h-Hell-Dunkel-Rhythmus, Makrolonkäfige, pelletiertes Rattenalleinfutter, täglich Frischwasser, keine Pathogene) gehalten und durch qualifiziertes Personal betreut.

Lewis-Ratten wurden eingesetzt, weil eine gute Vergleichbarkeit mit der, ebenfalls an Lewis-Ratten durchgeführten, C-Protein-induzierten Myositis gegeben ist (Kohyama und Matsumoto, 1999). Die Tierversuche wurden unter dem Aktenzeichen 42502-2-1043 genehmigt (Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Referat 203 Verbraucherschutz, Veterinärangelegenheiten).

3.2 Reagenzien

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>
gp120	ProSpec (East Brunswick, USA)
Tris- (hydroxymethyl)-amino- methan-Methanol	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Aqua dest.	Universitätsapotheke Halle
Acetone	Sigma Aldrich Chemicals (Steinheim)
Roti- Histokitt II	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
HCl (1N)	MERCK KgaA (Darmstadt)
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Biotin-SP-conjugated Affini- pure Goat Anti-Mouse IgG	DIANOVA GmbH (Hamburg)
Anti-mouse Ig HEP Detection Kit	BD Pharmingen (San Diego, USA)

Purified Mouse Anti-Rat CD8a	BD Pharmingen (San Diego, USA)
Purified Mouse Anti-Rat CD3	BD Pharmingen (San Diego, USA)
Anti Rat CD4	DIANOVA GmbH (Hamburg)
Normal Goat Serum	DIANOVA GmbH (Hamburg)
Antibody Diluent for ICH	BD Pharmingen (San Diego, USA)
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Hämatoxylin	MERCK KgaA (Darmstadt)
GOMORI-Lösung	Muskellabor Universitätsklinik Halle
Einbettmedium	Leica instruments GmbH (Nussloch)
Polysine Slides	Thermo Scientific (Bremen)
0,05M Trispuffer pH 7,6	12,2g Tris + 300ml Bidest, pH Einstellen mit 1N HCL

3.3. Dosisfindung

In einer Pilotstudie wurde die optimale Dosis gesucht, welche gerade eine ausreichende intramuskuläre Inflammation bewirkte. Hierzu wurde fünf Ratten eine aufsteigende Verdünnungsreihe von gp120 (0,05µg/ml; 0,5µg/ml; 5µg/ml; 50µg/ml und 500µg/ml) in den M. quadriceps femoris injiziert. Eine sechste Ratte erhielt eine NaCl-Injektion um eine Kontrolle mitzuführen. Die injizierte Menge betrug jeweils 50µl. Dabei lag die niedrigste Dosierung von gp120 bei 0,05 µg/ml und die höchste bei 500µg/ml. Drei Tage nach der intramuskulären Injektion wurden die Tiere geopfert und die Schnitte HE gefärbt. Eine floride Entzündung konnte ab 50µg/ml ausgemacht werden. Um regelmäßig eine Entzündung auslösen zu können, wurde nachfolgend stets eine Dosierung von 500µg/ml eingesetzt.

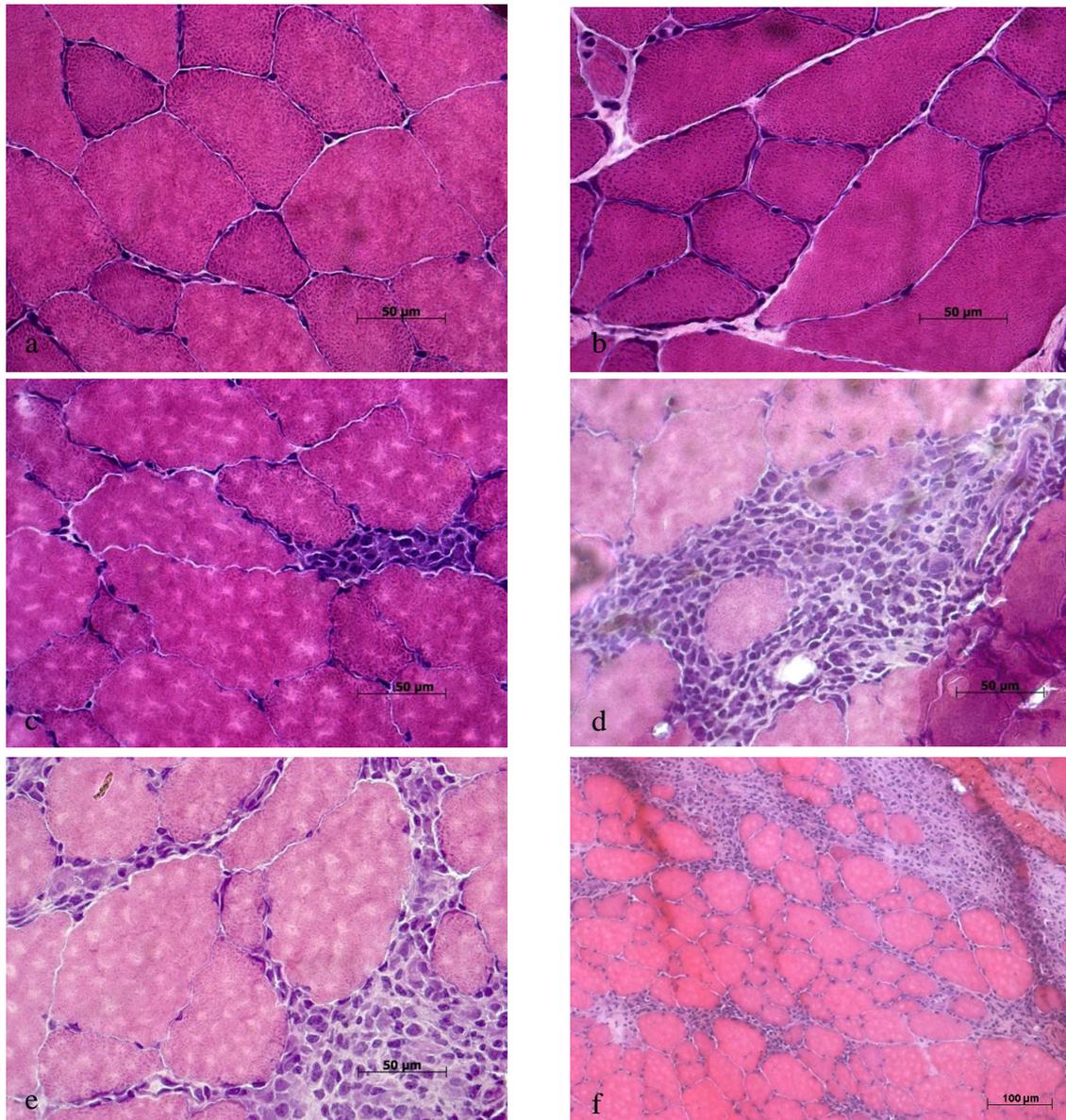


Abb.9: HE-Färbungen der Muskelgewebsschnitte nach gp120-Injektion. Deutlich ist eine Zunahme der Inflammation bei ansteigender gp120-Konzentration zu sehen. (a: Kontroll-Tier mit NaCl-Injektion; b: 0,05µg/ml gp120; c: 0,5µg/ml gp120; d: 5µg/ml gp120; e: 50µg/ml gp120; f: 500µg/ml gp120)

3.4 Intramuskuläre Injektion des Superantigens

Die Ratten wurden nach mindestens zehn Tagen Akklimatisierungszeit in den Tierställen einzeln in den Versuchsraum gebracht. Hier wurde das jeweilige Tier durch Isofluran mit einem UniVet Narkosegerät der Firma Groppler (Deggendorf) narkotisiert und präoperativ markiert.

Nach Sicherstellung, dass die Schmerzempfindung erloschen ist (mittels starker intraphalangealer Schmerzstimuli), wurde nach Auffinden der anatomischen Strukturen und Hautdesinfektion ein circa 0,5cm langer Schnitt über dem Musculus quadriceps femoris gesetzt und die Haut in diesem Bereich etwas auseinandergezogen. In diesem Bereich wurden mit einer Butterfly-Kanüle jeweils 50µl 0,9%-NaCl beziehungsweise gp120 (500µg/ml) in den exponierten M. quadriceps femoris injiziert. Anschließend wurde die Wunde mit einer Einzelknopfnaht verschlossen. Die Tiere wurden nachbeobachtet.



Abb.10: Experimentelles Vorgehen der gp120-Superantigen-induzierten Myositis.

3.5 Entnahme und Behandlung des Muskelpräparats

Nach ein, drei bzw. zehn Tagen wurde das Muskelpräparat entnommen. Hierzu wurden die Ratten einzeln in den Versuchsraum gebracht und in einer vorbereiteten Kammer tief mit CO₂ betäubt. Anschließend wurde die Tötung durch Genickbruch herbeigeführt. Es erfolgte die Entnahme des M. quadriceps femoris unter dem Injektionsort. Hierzu wurde ein etwa 2cm großer Hautschnitt über dem M. quadriceps femoris durchgeführt und mittig circa 1cm Muskel quer zum Faserverlauf abgetrennt. Der unzerteilte Muskel wurde unaufgeblockt 90 Sekunden lang unter stetigem Rühren in ein Gefäß mit Methylbutan getaucht, welches wiederum in flüssigem Stickstoff stand. Es erfolgte der Transfer in ein Cryo-Probengefäß, welches dann in flüssigen Stickstoff gelegt wurde. In dem Gefäß wurde die Probe bei -80°C gelagert. Die weitere Aufarbeitung mittels Gefrierschnitten erfolgte binnen vier Wochen.

3.6 Herstellung der Gefrierschnitte

Die Muskeln wurden am Gefriermikrotom Leica CM 3050 S (Leica Microsystems, Deutschland) geschnitten. Dazu wurde die Muskelprobe, welche zuvor bei -80°C gelagert wurde, für circa 20 Minuten bei etwa -20°C in das Gefriermikrotom gestellt. Nach diesem Zeitintervall wurde der Muskel mit Hilfe eines Einbettmediums auf den Objekthalter geklebt. Für alle immunhistochemischen Färbungen wurden $5\mu\text{m}$ dicke Schnitte hergestellt. Es wurden jeweils 60 Schnitte angefertigt, welche dann fortlaufend nummeriert wurden. Alle zehn Schnitte wurden jeweils ein Schnitt HE-gefärbt, um sicherzustellen, dass die Immunhistochemie den Bereich der Gewebsentzündung umfasste. Muskelgewebsschnitte wurden auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger aufgebracht und zwei Stunden bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Anschließend wurden sie zehn Minuten in Aceton fixiert, wiederum für 30 Minuten getrocknet und einzeln in Aluminiumfolie verpackt. Die Lagerungstemperatur der Schnitte betrug danach -80°C bis zur immunhistochemischen Färbeprozedur, die binnen acht Wochen vorgenommen wurde.

3.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Schnitte wurden frisch nach dem Schneiden gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte in Hämalaun-Lösung für zehn Minuten gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte solange mit frischem Leitungswasser gespült, bis das Wasser klar blieb. Es folgte ein zehnmütiges Bläuen in frischem Leitungswasser. Die Präparate wurden für eine Minute in 1% Eosin gefärbt und anschließend kurz in Leitungswasser gespült. Nachdem die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, zweimal absoluter Alkohol) durchlaufen hatten, wurden sie zweimal je fünf Minuten in Xylol gestellt. Die getrockneten Schnitte wurden mit Hilfe von Roti Histokitt II und einem Deckgläschen eingedeckt.

3.8 Immunhistochemische Färbung

Die Objektträger wurden von -80°C auf Zimmertemperatur gebracht. Es erfolgte ein Umkreisen der Präparate mit einem Diamantenschreiber und die exakte Beschriftung. Die Präparate wurden zur Rehydrierung für fünf Minuten in eine 0,05M Trispufferlösung eingestellt. Die

abgetrockneten Präparate wurden darauf zehn Minuten lang mit je 50µl unverdünntem Goat Anti-Mouse IgG inkubiert. Es folgte die Spülung mit Trispuffer und das dreimalige Einstellen der Schnitte in frischen Trispuffer für drei, vier und fünf Minuten. Je 50µl des primären Antikörpers wurden in der jeweiligen Verdünnung (CD3 1:20; CD4 1:200; CD8 1:30) mit Antibodydiluent auf die Präparate aufgetragen und für 60 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Erneutes Abspülen und Einstellen in bzw. mit Trispuffer. Auftragen von 50µl des sekundären biotinylierten Antikörpers in seiner spezifischen Verdünnung (CD3 und CD8 1:50, CD4 1:500) für 30 Minuten. Erneut Spülen mit und Einstellen in Trispuffer. Es wurde 50µl Streptavidin-HRP für 30 Minuten unverdünnt aufgetragen, welches nach der Inkubation wieder mit Trispuffer abgespült wurde. Die Schnitte wurden wieder dreimalig in frischen Trispuffer eingestellt (s.o.). Alle Inkubationen fanden in einer feuchten Kammer statt.

Das Streptavidin kann an das Biotin des Sekundärantiköpers binden. Durch ein Chromogen (Diaminobenzidin, DAB) kann das Peroxidaseenzym sichtbar gemacht werden. Hierzu wurden unter dem Abzug je 50µl DAB-Lösung auf die Präparate verteilt, diese wurden 15 Minuten inkubiert und anschließend mit Trispuffer abgespült. Es erfolgte das dreimalige Einstellen in frisches Leitungswasser für je drei Minuten und dann die Gegenfärbung mit Hämalaun 1:4 verdünnt für zwei Minuten. Nach kurzem Spülen wurden die Präparate in frischem Leitungswasser für fünf Minuten gebläut. Die Schnitte durchwandern eine aufsteigende Alkoholreihe von 15 Sekunden in 70%, 30 Sekunden in 96% sowie zweimal zwei Minuten in absolutem Alkohol. Dann zweimal fünf Minuten Einstellen in Xylol. Die Präparate wurden mit Roti Histokit II eingedeckt.

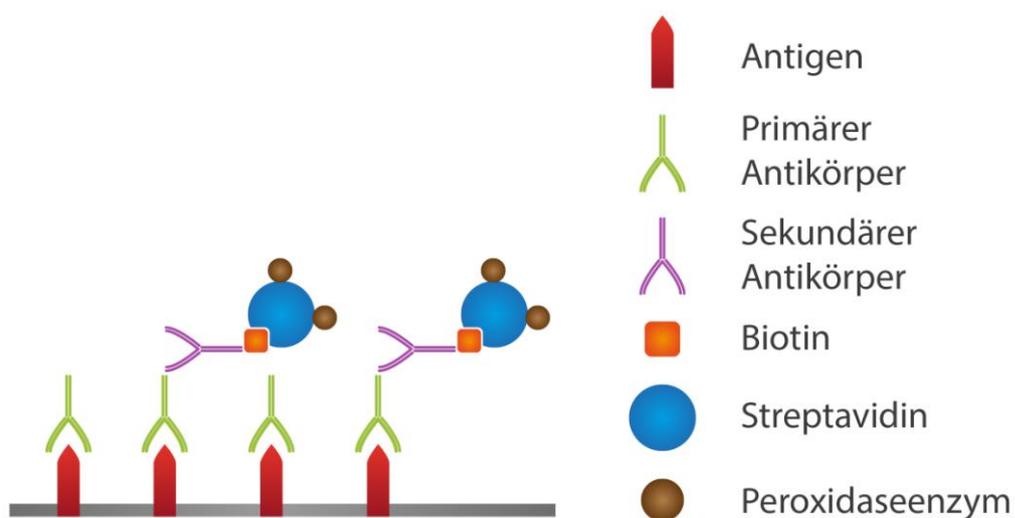


Abb.11: Schematische Darstellung der Labeled Avidin-Biotin- Methode (angelehnt an Vorlagen der Firma DAKO).

3.9 Modifizierte Gomori-Trichom-Färbung

10µm dicke Schnitte wurden auf Zimmertemperatur erwärmt und anschließend für zehn Minuten in Hämatoxylin-Lösung gestellt. Nach ausgiebigem Spülen mit Leitungswasser wurden die Schnitte für zehn Minuten in Leitungswasser gebläut und anschließend in eine GOMORI-Lösung für 20 Minuten eingestellt. Danach erfolgte ein direktes Einstellen der Schnitte für fünf Minuten in 0,2% Essigsäure. Die Schnitte wurden danach mit Aquadest gespült und anschließend einer aufsteigenden Alkoholreihe ausgesetzt. Nach zweimaligem Einstellen in Xylol erfolgte das Eindecken der Präparate mit dem Roti Histokitt II unter dem Abzug.

3.10 Positiv- und Negativkontrolle

Zu jeder Färbereihe wurde ein Milzpräparat einer Ratte mitgefärbt, um die Funktion der Materialien und korrekte Durchführung der Arbeitsschritte zu überprüfen. In der Milz als größtem lymphatischen Organ befinden sich verschiedene lymphatische Zellpopulationen in großen Mengen. Um eine unspezifische Anfärbung von Zellen auszuschließen, wurde zu jeder Färbereihe eine Negativkontrolle mitgeführt. Für diese Reagenzkontrolle wurde ein Milzpräparat der Lewis-Ratte, in dem viele der gesuchten Zellen vorhanden sind, ohne den entsprechenden primären Antikörper mitgefärbt. Durch den fehlenden Koppelmechanismus des gesuchten Antigens mit dem primären Antikörper, konnte der biotinylierte sekundäre Antikörper nicht binden und es kam zu keiner Färbereaktion.

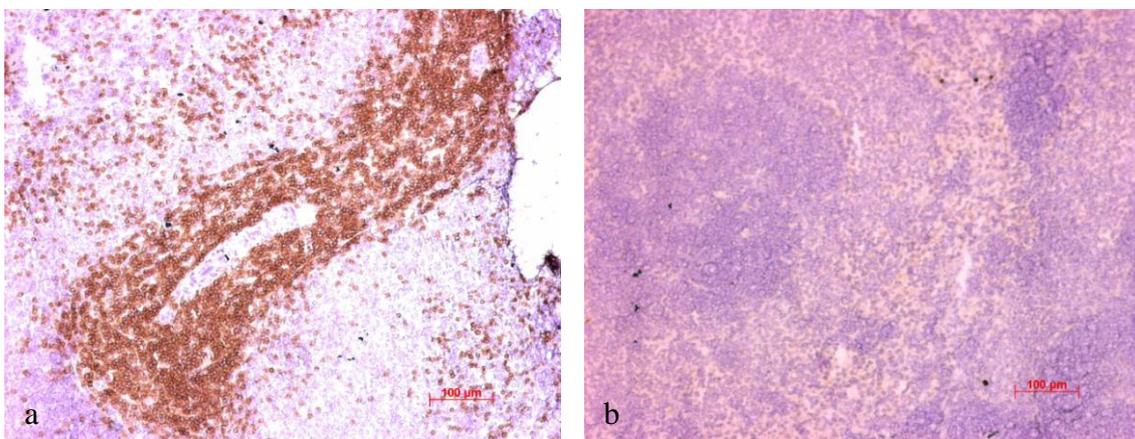


Abb.12: CD3 Positivkontrolle(a), sowie Negativkontrolle (b) , Milzschnitt.

3.11 Methode der Entzündungsbeurteilung

Alle Schnitte wurden am Mikroskop Axioplan (Zeiss) mit dem Okular Zeiss-Plan-NEOFLUAR (5x, 10x, 20x, 40x, 100x) bewertet (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland). Als Software wurde das Axio Vision Version 3.1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) angewandt. Um einem Bias durch den Betrachter vorzubeugen, wurde die Beschriftung der Schnitte im Schritt der Auszählung verdeckt.

Zuerst wurden die HE-Schnitte auf das Vorhandensein einer Entzündung gemustert. Dabei wurden angetroffene Lymphozytenansammlungen zwei Bewertungen unterzogen. Zunächst wurde ein auf der Zahl der beteiligten Muskelfasern basierender histologischer Score eingesetzt, welcher in Anlehnung an Kohyama und Matsumoto vier Kategorien umfasst (Kohyama und Matsumoto, 1999; Matsumoto et al., 2007). Hierbei stellt Kategorie 1 ein Entzündungsfeld, welches mindestens eine und maximal vier Muskelzellen beteiligt, Kategorie 2 zwischen fünf und 20 Muskelzellen und Kategorie 3 eine im ganzen Muskelfaszikel verteilte Entzündung mit Beteiligung von > 20 Muskelzellen dar. Kategorie 4 wird bei einer Ausbreitung über einen Muskelfaszikel hinaus vergeben.

Tab.1: Histologischer Score nach Matsumoto et al., 2007.

Score	Histologische Eigenschaften
1	Inflammation mit Beteiligung < 5 Muskelzellen
2	Inflammation mit Beteiligung > 5, < 20 Muskelzellen
3	Inflammation mit Beteiligung von > 20 Muskelzellen, auf einen Faszikel beschränkt
4	Ausbreitung einer Inflammation über einen Muskelfaszikel hinaus

In einem zweiten Auswerteschritt wurde die Fläche des von der Entzündung betroffenen Gewebsareals abgemessen. Bei der Auswertung der immunhistochem

ischen Schnitte wurde das Präparat nach der Stelle der größten Entzündung systematisch durchsucht. Zur Zählung der Lymphozyten wurde das Flächenzentrum der Entzündung gewählt und eine Fläche von 750µm mal 650µm untersucht. Dieses Areal schien geeignet zu sein, um Ausmaß und Art der Entzündung mit zumutbarem Aufwand näher zu bestimmen. Die Lymphozyten waren in der Regel homogen im Entzündungsbereich verteilt. Ein rechteckiger

Ausschnitt wurde gewählt, weil dies mit dem im Mikroskop sichtbaren rechteckigen Gewebsabschnitt leicht zu realisieren war. Somit konnte gewährleistet werden, dass Ausprägung und Muster der Entzündung am besten erfasst wurden. Es wurde eine Zählung aller in diesem Bereich befindlichen Lymphozyten durchgeführt. Zusätzlich wurden alle immunhistochemisch markierten Zellen (CD3, CD4 und CD8) ausgezählt. Die Auszählung erfolgte bei 40facher Vergrößerung rechnergestützt mit Hilfe des AxioVision 3.1 Programmes. In dieser Vergrößerung war eine maximal zu erfassende Anzahl an Lymphozyten möglich, welche gleichzeitig noch eindeutig als einzelne Zellen zuordenbar waren.

Abschließend wurde versucht, eine durch die Entzündung induzierte Größenänderung (etwa im Sinne einer Atrophie) der Muskelzellen zu erfassen. Um eine solche Beurteilung von Muskelzellen vornehmen zu können, sind pro Ratte und Schnitt je zehn aneinander grenzende Muskelzellen am Entzündungsgebiet und weitere zehn aneinander grenzende Muskelzellen in 1000µm Entfernung in ihrer Größe (Fläche) vermessen worden.

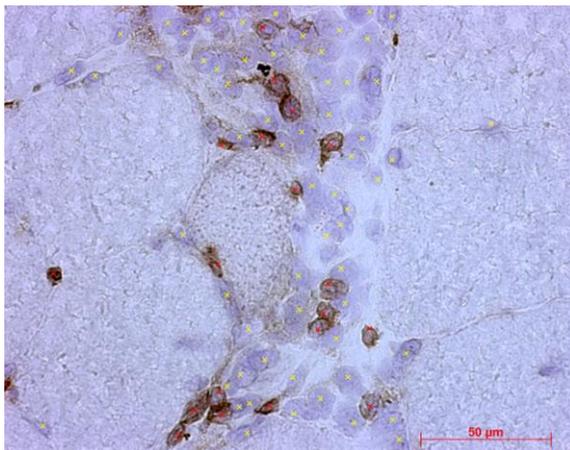


Abb.13: Vorgehen bei der Auszählung der Lymphozyten. „Positiv“ markierte, immunhistochemisch braun gefärbte Lymphozyten wurden rot gekennzeichnet, ungefärbte und damit „negative“ Lymphozyten wurden gelb markiert.

3.12 Statistik

Die statistische Auswertung der gemessenen Werte und die Erstellung der Diagramme wurde mit dem Programm IBM[®] SPSS Statistics Version 20 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen) durchgeführt. Die hier vorliegende deskriptive Arbeit hat eine Stichprobenzahl von 21 Ratten (13 mit Superantigen behandelte Tiere und 8 Kontrollen). Da bei dem Umfang der

Stichprobengröße ($n < 30$) nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann, wurde zum Vergleich der Expression des entsprechenden Oberflächenmarkers (CD3, CD4 und CD8) zwischen gp120-injizierten Tieren und NaCl-injizierten Tieren ein nicht parametrisches Testverfahren (Mann-Whitney U-Test) zur Testung auf Signifikanz verwendet. Im zeitlichen Verlauf wurde, soweit nicht anders beschrieben, der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Diese Tests eignen sich zur statistischen Auswertung, da sie für nicht parametrische Werte einer unverbundenen Stichprobengröße konzipiert sind (Mann und Whitney, 1947; Kruskal und Wallis, 1952). Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt.

3.13 Fehlerdiskussion

In jedem Fall konnte bei den gp120-Tieren ein Entzündungsherd ausgemacht werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass hier alle Entzündungen erfasst wurden. Bei den Kontrollen wurden teilweise keine Entzündungszeichen gefunden, sodass möglicherweise gering ausgeprägte Entzündungsherde nicht mit erfasst worden sind. Durch die Injektion direkt unterhalb des Hautschnittes und die Entnahme im injizierten Bereich sollte dieser Problematik vorgebeugt werden. Bei den immunhistochemischen Färbungen wurden stets eine Positivkontrolle und auch eine Negativkontrolle mitgeführt, sodass sowohl ein funktionstüchtiges Färbeset, als auch die korrekte Durchführung stets kontrolliert werden konnten. Durch kräftige Anfärbungen waren „positiv“-markierte Zellen in der Auswertung eindeutig zu identifizieren. Es konnte jedoch sowohl durch die teils schwache Gegenfärbung als auch durch lagerungsbedingte Verblässung zu Schwierigkeiten kommen, „negative“ Lymphozyten klar auszumachen. Hier kann es zu geringfügigen Abweichungen gekommen sein, die jedoch in der Kontrollgruppe und in der gp120-Gruppe gleichermaßen vorkamen.

Bei den NaCl-injizierten Tieren sollte die Zahl der CD3-positiven Zellen etwa der Summe aus CD4 und CD8 pos. Lymphozyten entsprechen. Die Zahl der CD3-positiven Zellen ist aber deutlich geringer als etwa die der CD8-pos Zellen an Tag 1. Obwohl das Färbeset in der CD3 positiv-Kontrolle eine kräftige Anfärbung der Lymphozyten zeigt, ist es denkbar, dass nicht alle tatsächlich CD3 positiven Zellen angefärbt wurden. Demzufolge ist die reale CD3-Depression nach Superantigeninjektion vermutlich geringer und somit in dieser Arbeit eher zu stark bewertet.

Der Ak gegen CD4 richtet sich bei Ratten nicht nur gegen T-Helfer-Zellen. Vielmehr wird CD4 auch auf Makrophagen exprimiert (Jefferies et al., 1985). So kann der T-Helfer-Zell-Anteil nicht

klar abgegrenzt werden. Der Anteil der CD4-positiven Zellen umfasst somit auch Makrophagen und es können keine sicher verwertbaren Rückschlüsse auf die Anzahl der T-Helferzellen gemacht werden.

B-Zellen konnten auf Grund des eingeschränkten Repertoires entsprechender kommerzieller Antikörper für die Ratte nicht immunhistochemisch untersucht werden. Jedoch sind etwa 90% der Immunzellen markiert. Somit kann von maximal 10% B-Zellen im Infiltrat ausgegangen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristik der Entzündung

In Anlehnung an die Arbeit von Matsumoto et al. wurden die Hämatoxylin-Eosin (HE) -Schnitte, wie oben beschrieben, mit einem histologischen Score bewertet. Hierbei fand sich ein klarer Unterschied zwischen den gp120-injizierten Ratten und den Kontrollen.

Bei den gp120-injizierten Ratten zeigte sich über alle untersuchten Zeiträume ein einheitliches Bild mit einer stark ausgedehnten Entzündung, die stets >20 Muskelzellen je Gewebsschnitt betraf. Dies entspricht einem Score-Wert von 3. Bei den Kontrollen war am Tag 1 ein durchschnittlicher Score von 1,3, am Tag 3 ein Score von 1,7 und am Tag 10 ein Score von 0,5 zu verzeichnen. Am 3. Tag nach Injektion war dieser Unterschied zwischen gp120- und Kontrolltieren statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Tab.2: Entzündungsausdehnung bei NaCl- und gp120-Ratten nach dem histologischen Score von Matsumoto et al., 2007.

Tag	NaCl-injizierte Ratten	Gp120-injizierte Ratten
1	1,33 ± 1,15	3,00 ± 0,00
3	1,67 ± 0,58	3,00 ± 0,00
10	0,50 ± 0,71	2,75 ± 0,50

Der starke Unterschied in der Ausdehnung der Entzündung ließ sich insbesondere beim Flächenvergleich der Entzündungsausdehnung (in mm^2) erkennen. Auch nach Injektion der NaCl-Lösung fand im Muskel eine Entzündungsreaktion statt, jedoch war diese insbesondere an Tag 1 nach Injektion zu finden und verglichen mit der Ausbreitung der Entzündung durch gp120 gering ausgeprägt. Nach Injektion von gp120 fand über den beobachteten Zeitraum hinweg eine stetige Zunahme der Entzündungsausdehnung statt.

Mittelwerte der Inflammationsgebiete

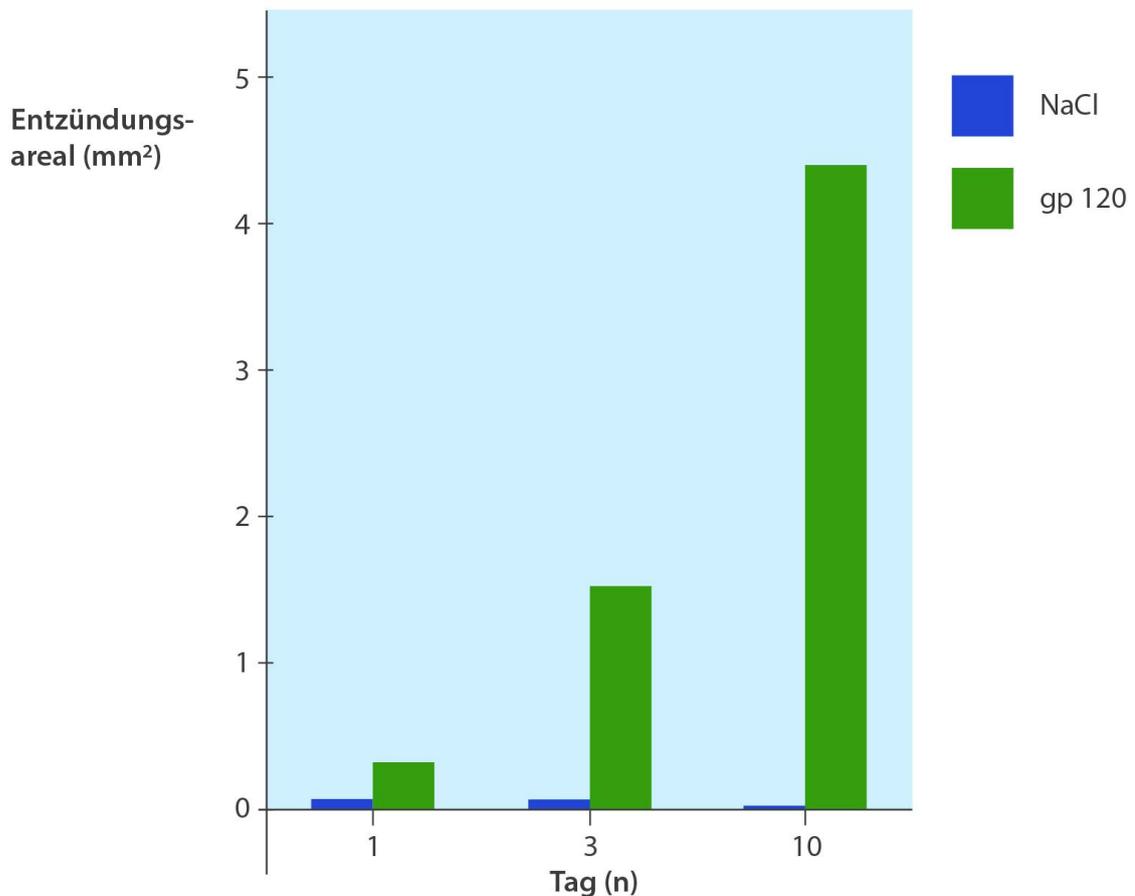


Abb.14: Graphische Darstellung der Ausdehnung der Entzündungsgebiete, gemessen an der durchschnittlichen Fläche von Lymphozytenansammlungen in mm². An allen beobachteten Tagen (n) waren die Unterschiede zwischen den gp120-injizierten und den NaCl-injizierten Tieren statistisch signifikant ($p < 0,05$).

An Tag 1 zeigte sich eine viermal so große Ausdehnung der Entzündung bei den gp120-Tieren, verglichen mit den Kontrollen. Diese Ausdehnung nahm weiter zu, veränderte jedoch ihren Charakter. An Tag 3 fand sich bei sämtlichen gp120-injizierten Ratten eine kompakte Lymphozytenansammlung von im Schnitt 1,49 mm². Des Weiteren ließ sich eine zunehmende Entzündungszellansammlung in der Peripherie feststellen, welche jedoch keine kompakten Entzündungsherde bildeten. Währenddessen war die ohnehin geringe Entzündungsausdehnung im M. quadriceps femoris der Kontrolltiere bereits leicht rückläufig. Es fanden sich auch hier kompaktere Lymphozytenansammlungen, jedoch nur in einer Ausdehnung von 0,06 mm², was 1/23 der Entzündungsfläche nach gp120-Injektion entspricht. An Tag 10 war die Entzündung in den Kontrolltieren fast vollständig abgeklungen. Es existierten kaum noch Lymphozytenansammlungen. Bei den gp120 Tieren war an Tag 10 eine

deutliche Lymphozytenvermehrung im ganzen Endomysium des Muskelfaszikels zu bemerken. Die Entzündung stellte sich nicht mehr kompakt, sondern als diffuse endomysiale Ansammlung von Lymphozyten dar. Diese Ansammlungen ließen sich weiterhin deutlich von dem Gewebe unterscheiden, an dem nicht die unmittelbare Entzündungsreaktion stattfand. Das inflammatorische Areal hatte sich nun bis fast auf das Dreifache ausgedehnt, verglichen zu dem Entzündungsbereich der gp120-Ratten an Tag 3 (vgl. Abb. 14). An allen beobachteten Tagen waren die Unterschiede zwischen den gp120-injizierten und den NaCl-injizierten Tieren statistisch signifikant

Im Vergleich der Flächen der Muskelfasern im Muskelquerschnitt im Bereich der zentralen Entzündung und denen der Peripherie ließen sich Unterschiede feststellen. Die entzündungsnah gelegenen Muskelfasern hatten eine geringere Fläche als die peripher gelegenen. Dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz auf dem 5%-Niveau, weder in der Verum-Gruppe noch in der Kontrollgruppe. Auch im Vergleich der mit gp120-injizierten Gruppe mit der NaCl-injizierten Gruppe ließen sich in den Muskelfaserflächen keine signifikanten Unterschiede feststellen, weder im Zentrum der Entzündung noch in der Peripherie. Dies trifft für die einzeln untersuchten Tage und für die Werte der Muskelfaserflächen an den Tagen 1, 3 und 10 gemeinsam betrachtet zu (Vergleich Abb. 15). Dabei spielt vermutlich der geringe Stichprobenumfang eine Rolle.

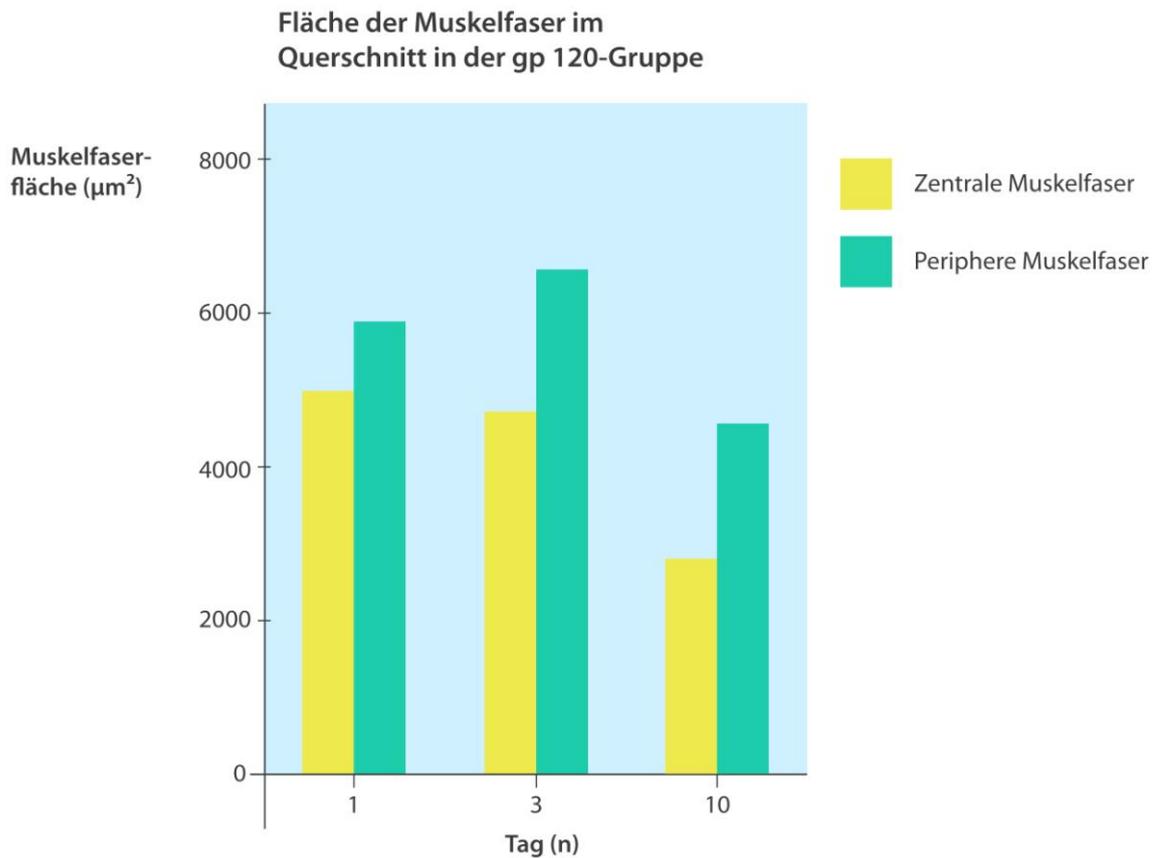


Abb.15: Vergleichende graphische Darstellung der Muskelfaserflächen zwischen peripheren und entzündungsnahen Muskelfasern nach gp120-Injektion im zeitlichen Verlauf. Es konnten im beobachteten Zeitraum nach gp120-Injektion eine Atrophie der entzündungsnahen Muskelfasern festgestellt werden, jedoch nicht in einem signifikanten Unterschied im Vergleich zur den Muskelfaserflächen in der Peripherie.

Die Schnitte mit der modifizierten Gomori-Trichom-Färbung wurden systematisch auf das Vorhandensein von Einschlusskörperchen untersucht. Es konnte in keinem Präparat eine fuchsinophile Vakuole als Zeichen einer Einschlusskörperchenmyositis gefunden werden (Huizing und Krasnewich, 2009).

4.2 Beschreibung der Entzündung an Hand der HE-Färbung

An Tag 1 nach Injektion ließen sich wenige Unterschiede in der HE-Färbung zwischen den gp120-Tieren und den Kontrollen feststellen. In beiden Gruppen fand sich eine ausgeprägte Entzündungsreaktion entlang des Stichkanals und teilweise darüber hinaus mit Lymphozyten in septalem Verteilungsmuster. Vereinzelt fanden sich bei den gp120-injizierten Ratten in die Muskelzelle eindringende Lymphozyten (Abb. 17). Es fanden sich in Lyse befindliche Muskelzellen (Abb. 17). Die Ausdehnung der Inflammation war bei den gp120-Schnitten signifikant größer als bei den Kontrolltieren (Abb. 14).

Tag 1, NaCl: Am Einstichkanal zeigten sich neben dem Gewebstraumata deutliche Lymphozytenansammlungen. Diese folgten streng dem Stichkanal, es gab kaum Ausläufer. Die Peripherie war nicht an der Entzündungsreaktion beteiligt. Perimysial ließen sich einige Lymphozytenhäufungen feststellen.

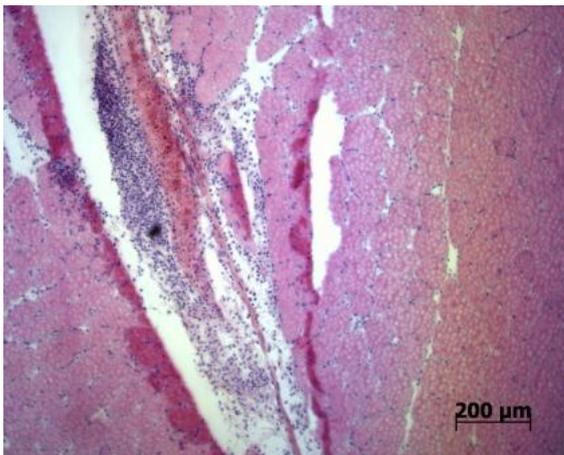


Abb.16: Tag 1, NaCl.

Tag 1, gp120: Es zeigte sich eine ausgedehnte Entzündungsreaktion entlang des Stichkanals. Ferner waren deutliche Zeichen der Gewebsverletzung durch die Injektion auszumachen. Zusätzlich zu der Entzündung um den Stichkanal fanden sich Ausläufer ins Endo- und Perimysium. Vereinzelt waren in Lyse befindliche Muskelzellen zu sehen, welche von Rundzellen infiltriert wurden.

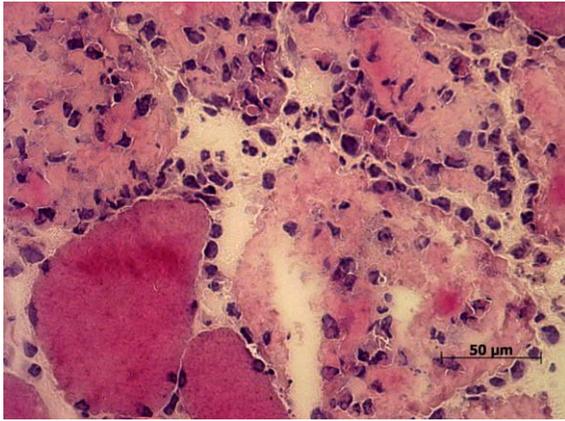


Abb.17: Tag 1, gp120.

Tag 3, NaCl: Die Entzündung um den Stichkanal war nicht mehr in seiner Deutlichkeit nachzuweisen. Es fanden sich einige kleine Lymphozytenansammlungen, insbesondere perimysial und perivaskulär. Peripher des Einstiches war keine Entzündungsreaktion festzustellen.

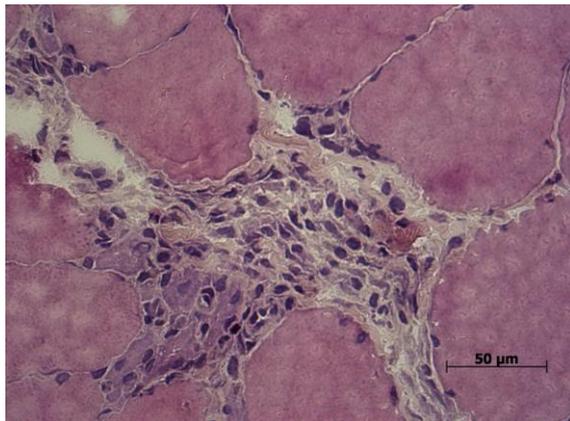


Abb.18: Tag 3, NaCl.

Tag 3, gp120: Es zeigte sich eine massive Lymphozytenansammlung, die nicht mehr mit dem Stichkanal assoziierbar war. Diese Ansammlung der Entzündung war am Tag 3 am kompaktesten. Es fanden sich einige in Auflösung befindliche Muskelzellen (Abb. 19). Diese Muskelzellen waren zum Teil noch in ihrer Gestalt sichtbar, wurden jedoch von zahlreichen Lymphozyten infiltriert.

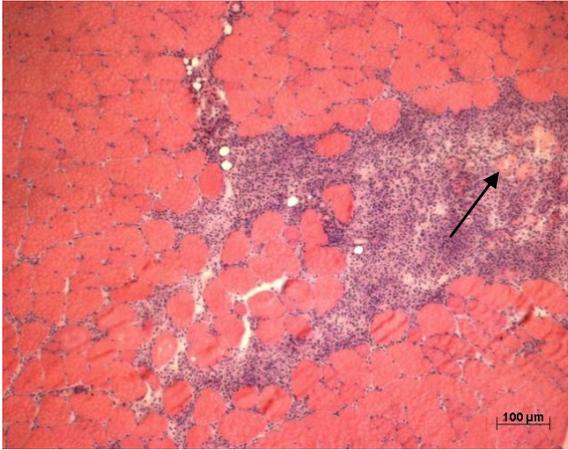


Abb.19: Tag 3, gp120, der Pfeil deutet auf sich auflösende, von Rundzellen infiltrierte Muskelzellen

Die Lymphozytenansammlungen waren im Endomysium lokalisiert, zum Teil fanden sich kleinere Lymphozytenansammlungen perimysial. Im Entzündungsherd waren kleine Gefäße sichtbar. Perivaskulär waren jedoch keine Prädelektionsstellen für Lymphozytenansammlungen auszumachen. Von der zentralen Entzündung ausgehend, fanden sich septale Entzündungsausläufer (Abb. 19).

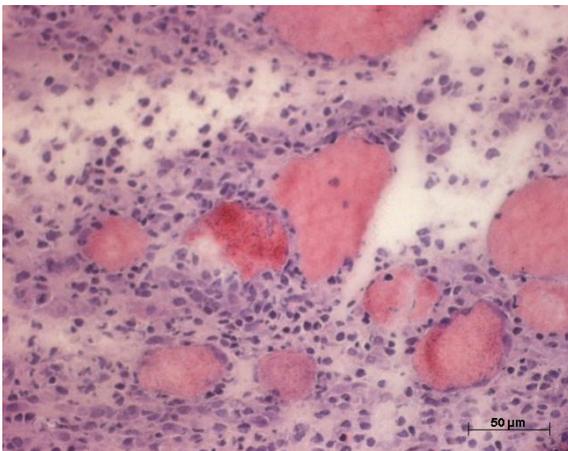


Abb.20: Tag 3, gp120, von Lymphozyten infiltrierte Muskelzellen, sowie in Lyse befindliche Muskelzellen.

Tag 10, NaCl: Das HE-Bild wies keine stärkeren Entzündungszeichen mehr auf. Es fanden sich perimysial und perivaskulär einige Lymphozytenhäufungen. Endomysial fanden sich keine kompakten Lymphozytenansammlungen (Abb. 21).

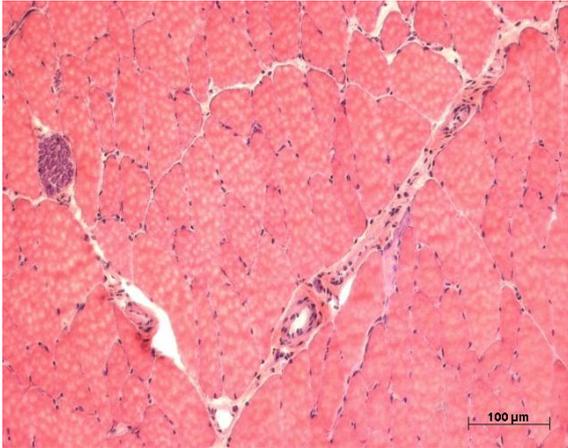


Abb. 21: Tag 10, NaCl

Tag 10, gp120: Das Entzündungsbild war von einer starken, diffusen, endomysialen Zunahme von Lymphozyten gekennzeichnet. Die Entzündung grenzt sich entsprechend der diffusen Rundzellinfiltration und auch durch ein basophileres Sarkoplasma als etwas stärker gefärbter Bereich vom umgebenden Muskelgewebe ab (Abb. 22). In diesem streifenförmigen Bereich fanden sich viele Regeneratfasern. Die sich regenerierenden Muskelzellen waren durch ihre kleinere Größe, zentralständige Zellkerne und basophiles Sarkoplasma gekennzeichnet. In der Ausdehnung nahm die Entzündung gegenüber Tag 3 weiter zu (Abb. 14), jedoch fand sich keine kompakte Lymphozytenansammlung mehr. Im Zentrum der Entzündung fanden sich viele in Lyse befindliche Muskelzellen. Sie wurden von Lymphozyten infiltriert.

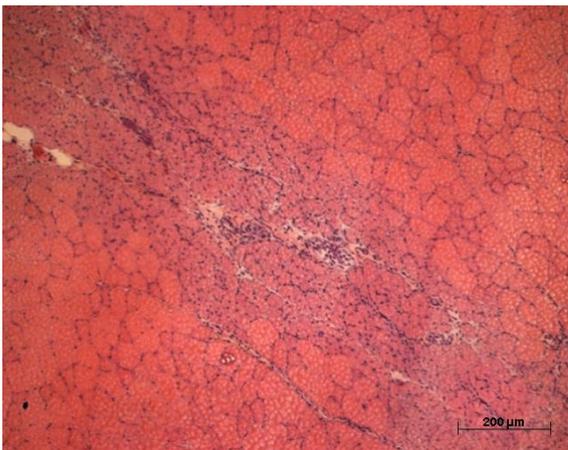


Abb.22: Tag 10, gp120, deutlich ist das Areal der Lymphozytenansammlung auszumachen, die Muskelzellen wirken verkleinert.

4.3 Immunhistochemische Färbung: Allgemeine Befunde

4.3.1 CD3

Für den Pan-T-Zellmarker CD3 stellte sich im Entzündungsbereich eine disseminierte Verteilung dar. 24 Stunden nach Injektion ließen sich keine Unterschiede zwischen Verum- und Kontrollgruppe im Verteilungsmuster der CD3-positiven Zellen ausmachen. Drei Tage nach der Injektion fanden sich bei den Kontrolltieren vereinzelt kleine Entzündungsherde. In den gp120-injizierten Muskeln hatte sich eine kompakte Entzündung gebildet. Es fanden sich große Lymphozytenansammlungen ($> 0,1 \text{ mm}^2$), in welchen sich vereinzelt CD3-positive Zellen anfärbten. Es gab keine vermehrten perivaskulären Rundzellularinfiltrate. Am Tag 10 ließen sich bei den Kontrolltieren, welche keine Entzündungsherde mehr aufwiesen, zwar einzelne CD3-Zellen nachweisen, welche jedoch nicht spezifisch angeordnet waren. Bei den gp120-Tieren fanden sich diffuse endomysiale Vermehrung von Lymphozyten. CD3-positive Lymphozyten waren im Entzündungsfeld verteilt zu finden.

4.3.2 CD4

Der Anteil CD4-positiver Zellen war an Tag 3 der dominierende Zelltyp. Diese Zellen verteilten sich diffus im Rundzellularinfiltrat und im Endomysium. Vereinzelt invadierten CD4 positive Lymphozyten in Muskelzellen. Die Zellen kamen im gesamten Entzündungsraum vor, waren jedoch insbesondere am Rand der Entzündung und damit an bisher noch nicht betroffenen Muskelzellen gelegen. Diese Prädelektionsstelle der CD4-positiven Zellen war an Tag 1 nach Injektion noch nicht ausmachbar. Hier fanden sich im Entzündungsgebiet sowohl bei gp120- als auch bei Kontrolltieren im Entzündungsinfiltrat diffus verteilte CD4⁺-Lymphozyten. Am Tag 10 fanden sich diese kompakten Lymphozytenansammlungen nicht mehr. Vereinzelt fanden sich im Entzündungsgebiet CD4⁺-T-Zellen, welche in Muskelzellen invadierten.

4.3.3 CD8

Die durch gp120 induzierte Entzündung war stark durch CD8-positive Zellen geprägt. Es fanden sich sowohl am Tag 1, als auch am Tag 3 nach Injektion mehrere in die Muskelzelle invadierende CD8⁺-T-Zellen (Abb. 23a). Die invadierte Muskelzelle wies dabei keinen unterschiedlichen Umfang im Vergleich zu nicht invadierten Muskelzellen auf. Es kann also nicht von nekrotischen Muskelzellen ausgegangen werden. An allen untersuchten Tagen kamen CD8⁺-Lymphozyten im Entzündungsbereich vor. Die Zellen waren gleichmäßig im Endzündungsherd verteilt und waren peripher von Entzündungsort kaum anzutreffen. Im

Einklang dazu fanden sich bei den Kontrollen nur an Tag 1 einige CD8⁺-T-Zellen. An Tag 3 und Tag 10 waren diese Zellen bei den Kontrolltieren kaum vertreten.

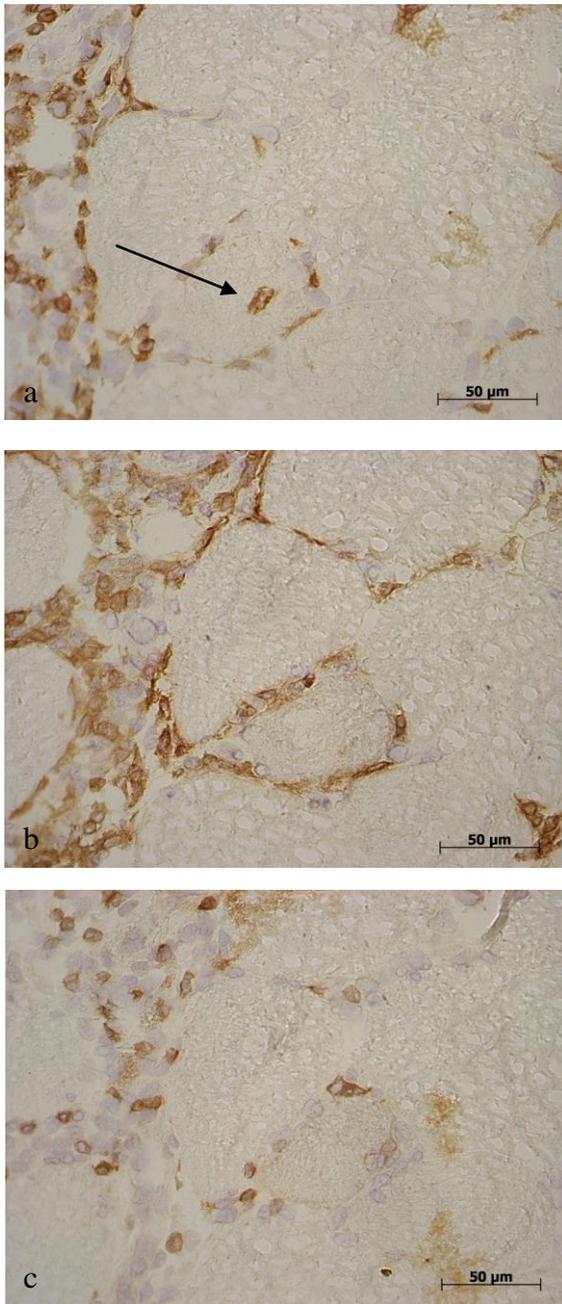


Abb.23: a: CD8-Färbung, gp120, Tag 3; Eine CD8⁺-Zelle (Pfeil) invadiert in eine nicht-nekrotische Muskelfaser; b: CD4-Färbung, gp120, Tag 3; c: CD3-Färbung, gp120, Tag 3; Deutlich ist zu erkennen, dass CD4- und CD8-positive Zellen zum Teil keine zusätzliche CD3-positive Markierung aufweisen. (CD: Cluster of Differentiation, gp: Glykoprotein).

4.4 Lymphozytensubpopulationen im zeitlichen Verlauf

Zu allen drei Zeitpunkten nach gp120-Injektion war die Population der CD3-positiven Zellen signifikant kleiner als die der CD4- beziehungsweise CD8-positiven Zellen (Vergleich auch Abb. 23 oder Abb. 25). Die Entzündung erreichte ihr Maximum klar an Tag 3 mit der jeweils höchsten gemessenen Zahl an CD4- sowie CD8-positiven Lymphozyten.

Die NaCl-injizierten Ratten zeigten eine Anhäufung von CD3-positiven Zellen am ersten Tag nach Injektion. Diese fielen danach (Tag 3 sowie 10) stetig ab.

Die stärkste CD4⁺-Lymphozyten-Ansammlung ließ sich an Tag 3 feststellen. Sowohl gp120-injizierte Muskeln als auch Kontrollen zeigten an Tag 3 ihr Entzündungsmaximum. Die Anzahl ist bei den gp120-injizierten Tieren mit einer über dreifach erhöhten Anzahl signifikant unterschiedlich zu den NaCl-injizierten Tieren. Des Weiteren kann bereits am Tag 1 nach Injektion ein signifikanter Unterschied bei den gp120 behandelten Tieren mit 32% CD4 positiven Zellen gegenüber den Kontrollschnitten mit 14% CD4-positiven T-Zellen gezeigt werden.

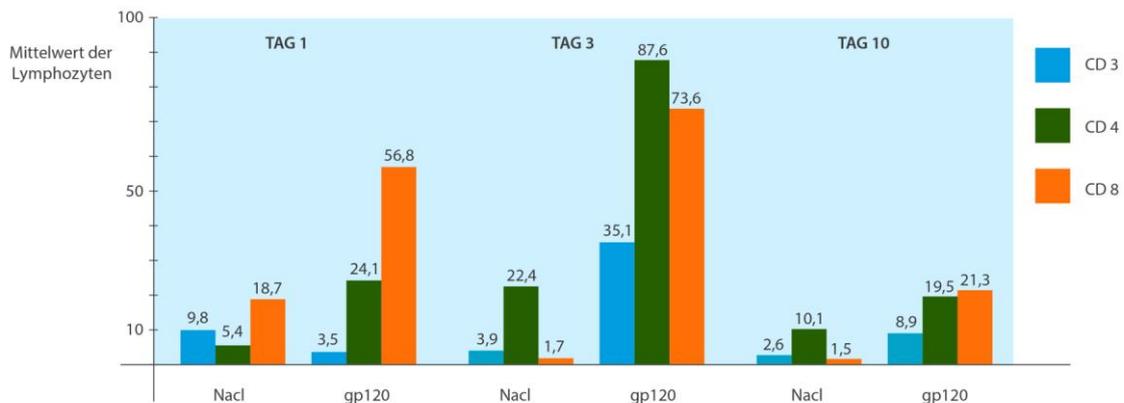


Abb.24: Übersicht der Lymphozyten im zeitlichen Verlauf. Aufgezeigt sind die absoluten Mittelwerte der jeweiligen Zellpopulationen (CD3, CD4 oder CD8) der Muskelgewebsschnitte. Das Entzündungsmaximum lag bei den gp120-injizierten Ratten an Tag 3. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied der CD4- und CD8-positiven Zellen gegenüber den mit NaCl behandelten Kontrolltieren ($p < 0,05$). Diesen signifikanten Unterschied von CD4- und CD8-positiven Zellen gegenüber den Kontrolltieren konnte bereits an Tag 1 der Untersuchung festgestellt werden. (CD: Cluster of Differentiation, NaCl: Natriumchlorid, gp: Glykoprotein).

Ähnlich verhielten sich die Werte der CD8-positiven Lymphozyten. Während die Kontrollreihe einen einmaligen CD8-Anstieg am Tag 1 zeigte, welcher am Tag 3 sowie 10 nicht mehr nachweisbar war, zeigten die mit gp120 behandelten Muskeln ein prozentuales Maximum am Tag 1, welches im zeitlichen Verlauf stetig absank.

Signifikante Unterschiede ergaben sich für CD8 sowohl am Tag 1 (59% CD8-positiv Zellen bei den gp120-Ratten gegenüber 28% bei den Kontrolltieren), als auch am Tag 3 (44% CD8-positiv Zellen bei den gp120 Ratten gegenüber 4% im Vergleich zur Kontrollgruppe).

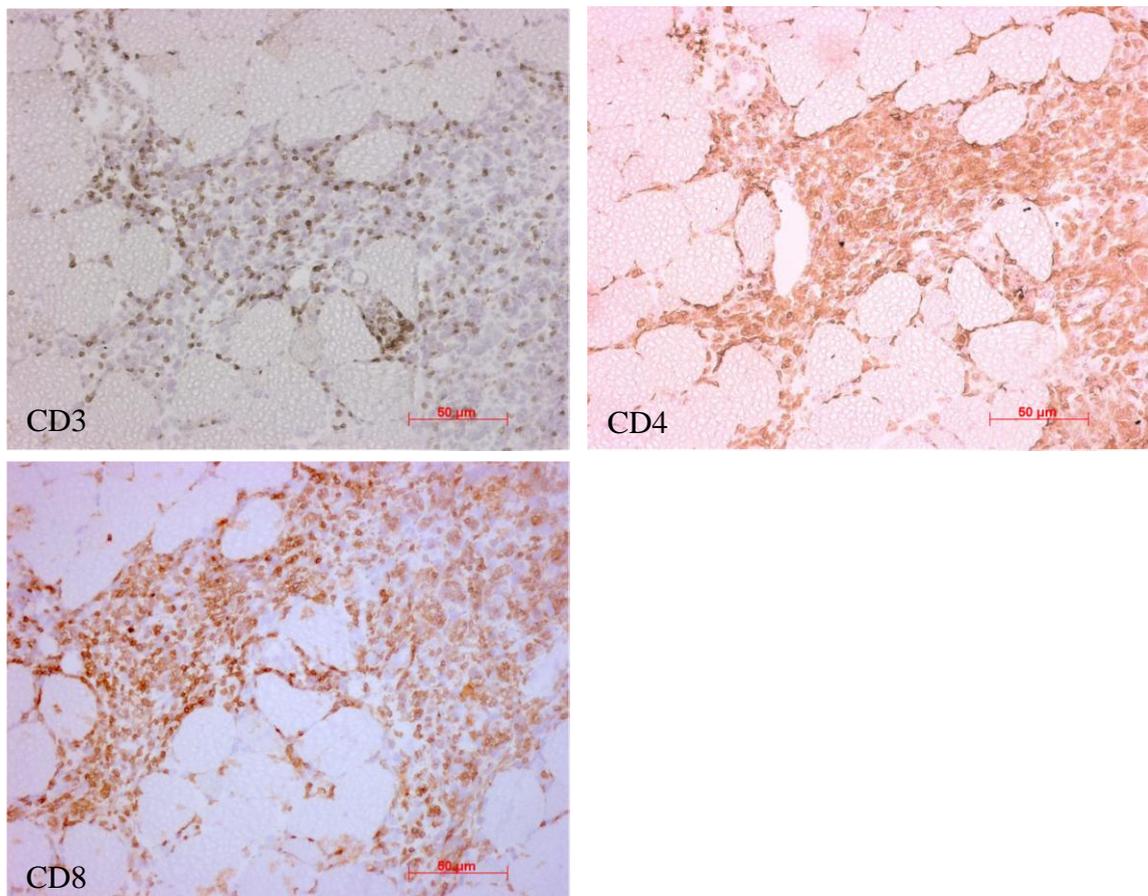


Abb.25: Beispiele der durch gp120-induzierten Entzündung in den jeweiligen immunohistochemischen Färbungen (CD3, CD4 und CD8) an Tag 3 nach Opferung. Auffällig war die kompakte Entzündung, welche durch CD4- und CD8-positiv Zellen geprägt war (CD: Cluster of Differentiation, gp: Glykoprotein).

5 Diskussion

5.1. Allgemeine Überlegungen

Die Wirkung von Superantigenen auf den menschlichen Körper und die Rolle von Superantigenen in Krankheiten ist bisher nur wenig erforscht. Angesichts des vielfachen Vorkommens von Superantigenen bei Bakterien und Viren einschließlich den sogenannten Humanen endogenen Retroviren (HERV), überrascht dieser Mangel an Untersuchungen.

Superantigene können über eine besondere T-Zell- oder B-Zell-Rezeptor-Bindung eine Vielzahl an T- und B-Zellen aktivieren (Herman et al., 1991; Berberian et al., 1993). Eine Erkrankung, bei der die Wirkung von Superantigenen auf den Körper bereits gut untersucht ist, ist das durch die Enterotoxine B und C sowie das Toxic Shock Syndrome Toxin-1 von *Staphylococcus aureus* induzierte Toxische Schocksyndrom (Xu und McCormick, 2012). Hier kommt es durch die Wirkung von bakteriellen Superantigenen zu einem Kreislauf aus Zellproliferation und Zytokinsekretion, welcher bis zum Multiorganversagen führen kann (Lappin und Ferguson, 2009).

Neben der intensiven Erforschung von bakteriellen Superantigenen auf den Körper, ist auch die Beteiligung von viralen Superantigenen an der Pathogenese von Krankheiten interessant, sodass in dieser Arbeit der Wirkung des viralen Superantigens gp120 auf den Muskel nachgegangen wurde.

5.2 gp120 als Auslöser einer Myositis

Gp120 ist Bestandteil des Humanen Immunodefizienz-Virus und wurde als virales Superantigen bereits bestätigt (Berberian et al., 1994; Jason et al., 1997). Dabei wurde eine superantigene Wirkung sowohl auf T-Lymphozyten (Laurence et al., 1992; Zoulai, 2007) als auch auf B-Lymphozyten gezeigt (Berberian et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von gp120 auf T-Zellen betrachtet. Dazu wurden CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen im Muskel analysiert. Tatsächlich belegen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass gp120 eine Entzündungsreaktion im Muskel und somit eine Myositis auslösen kann. Diese Entzündung war bei alleiniger Verwendung des Lösungsmittels nicht nachweisbar und ist daher der Wirkung von gp120 zuzurechnen. Zur Auslösung der Entzündung bedurfte es keiner zusätzlichen Faktoren wie etwa eines Adjuvans. Derartige zusätzliche Stimulanzen (zum Beispiel

komplettes Freundsches Adjuvans) sind für die Auslösung von Autoimmunität durch konventionelle Antigene nötig, um die Immuntoleranz zu durchbrechen (Billiau und Matthys, 2001). Insofern erscheint die Entzündungsauslösung durch das Superantigen gp120 der Situation spontan auftretender sogenannten autoimmuner Entzündungsreaktionen näher zu kommen als dies bei der Induktion mit konventionellen Antigenen bislang der Fall ist.

Die Entzündung, welche hier durch gp120 hervorgerufen wurde, zeigt eine kompakte Anhäufung sowohl von CD4- als auch von CD8-positiven T-Lymphozyten im Endomysium (zur Definition „Endomysium“ vgl. Abb. 1). Dabei war die Zahl der CD3⁺-Lymphozyten stets kleiner als die der CD4⁺- beziehungsweise der CD8⁺-Zellen. Zusätzlich ist eine Invasion von zytotoxischen T-Zellen und/oder Makrophagen in nicht-nekrotische Muskelfasern auffällig. Im Folgenden werden diese Befunde näher betrachtet.

5.3 Pathogenetische Überlegung zur gp120 induzierten Myositis

5.3.1 Initiierung einer muskulären Entzündung durch gp120

Die Wirkung von gp120 auf Myozyten ist in der Literatur bisher kaum beschrieben.

Wenn ein konventionelles Antigen im Muskel durch Injektion freigesetzt wird, folgt die Aufnahme und Prozessierung durch antigenpräsentierende Zellen (APC) und ggf. die Präsentation von Antigenbruchstücken auf der Oberfläche der APC auf MHC Klasse II Molekülen. Danach kann eine Entzündungsreaktion folgen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde gp120, ein Bestandteil des HIV injiziert, welches bereits in mehreren Arbeiten als Superantigen beschrieben wurde (Berberian et al., 1993; Zoulai, 2007). Wie bereits ausgeführt werden Superantigene unprozessiert an MHC-Moleküle von APC gebunden und präsentiert. Im vorliegenden Fall war die entstandene Entzündung durch ein hohes Vorkommen an CD4- und CD8-positiven Zellen charakterisiert. Dem gegenüber war der Anteil an CD3-positiven Zellen relativ gering ausgeprägt. Eine Herunterregulierung der CD3-Oberflächenmarker ist ein typisches Phänomen nach Superantigenkontakt auf welches unten noch näher eingegangen wird (Niedergang et al., 1995; Page et al., 2004; von Essen et al., 2004).

Eine Aktivierung von CD4- und CD8- positiven Zellen ist eine zu erwartende Reaktion auf ein fremdes Antigen. So überrascht eine Entzündungsreaktion sowohl auf gp120, als auch auf NaCl an Tag eins der Untersuchungen nicht. Die Reaktion auf gp120 fällt deutlich stärker aus, als die auf das Kontrollmedium. Bereits an Tag3 ist die Entzündungsreaktion gegen NaCl merklich

abgeklungen, während die Inflammation nach gp120 Injektion noch zunahm. An Tag 10 findet sich eine reduzierte Anzahl an Rundzellen, jedoch ist im Vergleich zur Kontrollgruppe der Entzündungsort noch klar auszumachen. Es finden sich weiter viele Lymphozyten im Entzündungsgebiet, die Myozyten sind kleiner als in Gebieten ohne Inflammation und das Sarkoplasma basophiler. Über den gesamten Untersuchungszeitraum findet sich eine hohe Anzahl an CD8-positiven Zellen, nur an Tag 3 ist die Anzahl von CD4-positiven Zellen höher. Die bisherigen Untersuchungen von gp120 könnten dafür Erklärungen bieten.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass gp120 in der Lage ist, eine Neuroinflammation auszulösen (Holguin et al., 2004; Schoeniger-Skinner et al., 2007; Shah und Kumar, 2010; Shah et al., 2011). Insbesondere durch die Interleukine 6 und 8, welche nachweislich nach gp120-Kontakt sezerniert werden, kommt es zu einer Entzündungsreaktion mit Anstieg der Akute-Phase Proteine und einer Aktivierung von T-Zellen (Shah und Kumar, 2010; Shah et al., 2011). Das hohe Vorkommen der CD4-Zellen in dieser Arbeit ist durch eine solche Zytokinproduktion gut zu erklären. Am ersten Tag der Entzündung war der Anteil der CD8-positiven Lymphozyten deutlich führend vor den CD4-positiven Zellen (Abb. 24). Dies korreliert mit Beobachtungen einer CD8-Expansion in frühen Stadien der HIV- Erkrankung (Pantaleon et al., 1994; Hoffenbach et al., 1989). Einen gp120-abhängigen Effekt konnte mit Hochregulierung bestimmter V β -Regionen gezeigt werden (Jason et al., 1997). Danach, also am Tag 3, dominierten im Entzündungsinfiltrat demgegenüber bereits CD4-positive Lymphozyten (Abb. 24). Dies könnte als unspezifische Bystander-Rekrutierung als Folge der initialen, über CD8-positive Lymphozyten vermittelten Zytokinfreisetzung sein.

Der Effekt von gp120 auf Zellen des Immunsystems ergab in der Vergangenheit teils widersprüchliche Ergebnisse. Wie bereits im Kapitel 1.5 beschrieben kommt es bei einem Superantigenkontakt paradoxerweise nach einer initialen massiven Aktivierung zu einer Anergie und Deletion der zuvor proliferierenden Zellen (Kawabe und Ochi 1990, Berberian et al., 1993; Gougeon et al., 1993, Torres et al., 2001). Insbesondere auf dendritische Zellen und auf CD4-positive Zellen scheint gp120 eine suppressorische Wirkung zu haben (Weinhold et al., 1989; Jason et al., 1997; Chougnat und Gessani, 2006). In anderen Arbeiten wird neben der bekannten B-Zell-Superantigen-Eigenschaft von gp120 auch eine Wirkung auf die T-Zellen vermutet (Zoulai, 2007). Unterstützend zu dieser Annahme wurde nach gp120 Stimulation eine Hochregulierung von bestimmten V β -Einheiten beschrieben (Laurence et al., 1992; Jason et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde nach gp120-Kontakt eine starke Entzündungsreaktion festgestellt, so dass zu dem untersuchten Zeitpunkt eine Suppression der Immunzellen eher nicht vorlag. Möglicherweise wurde hier nach Injektion von gp120 die Initialphase mit

Proliferation der T-Zellen erfasst. Eine Beurteilung der T-Zellen nach 10 Tagen ist nicht erfolgt. Somit konnte eine eventuell folgende Deletion auch nicht erfasst werden.

5.3.2 CD3-Depression bei der gp120-Myositis

Die Untersuchung des T-Zellmarkers CD3 in dieser Arbeit hat ergeben, dass CD3 an jedem Tag im Vergleich zu den Lymphozytenmarkern CD4 und CD8 unterexprimiert ist. In aller Regel wird CD3 auf der Oberfläche sämtlicher T-Zellen exprimiert, da er in Verbindung mit dem TCR vorkommt (Malissen et al., 1999; Call et al., 2002). Physiologischerweise kommen dementsprechend T-Zellen, die CD3 nicht exprimieren kaum vor. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass derartige T-Zellen ohne CD3-Expression in ihrer Funktionsweise gestört sind (Klausner und Samelson, 1991). Daher überrascht das hier gefundene Ergebnis, welches zeigt, dass die lymphozytäre Expression von CD3 relativ zu CD4 beziehungsweise CD8 verringert ist. Eine CD3-Herunterregulierung ist nicht nur in dieser Arbeit auffällig gewesen. Auch Trimble und Lieberman stellen dieses Phänomen bei HIV-Erkrankten fest (Trimble und Lieberman, 1998). Über das Phänomen der TCR-Herunterregulierung wurden bereits mehrere Arbeiten verfasst. Die Liganden-induzierte Rezeptor Herabregulierung wird als Mechanismus zum Schutz vor schädlicher Überstimulation betrachtet (Bonefeld et al., 2008). So ist die Depression der CD3-Oberflächenantigen durch die immense Zytokinsekretion nach Superantigenkontakt zu erklären. Bei Ag-Erkennung durch TCR und CD3 kommt es zur Tyrosinbildung. Dadurch entsteht intrazellulär freies Ca^{2+} , welches zur IL2-Produktion führt (Zehn et al., 2012). IL2 wiederum regt die T-Zell-Proliferation an. In diesem Zyklus, mit Aktivierung einer großen Anzahl an T-Lymphozyten, käme es zu einer überschießenden Immunantwort. Durch die massive Ausschüttung von Zytokinen kann es zu schädlichen Reaktionen auf den Körper kommen (Lappin und Ferguson, 2009). Eine Herabregulierung des CD3/TCR-Komplexes und damit einer Unterbrechung des Signalweges zur T-Zell-Stimulation wäre eine Möglichkeit, die Zytokinseznierung zu kontrollieren.

Bis vor kurzem war noch nicht klar, ob es zu einer Herabregulierung des TCR an der Zelloberfläche durch eine Erhöhung der Endozytoserate oder durch eine Verminderung der Expressionsrate des TCR kommt. Von Essen et al. untersuchten dieses Phänomen an menschlichen T-Zell Linien (Essen et al., 2004). Sie stellten bei nicht stimulierten T-Zellen eine Halbwertszeit von 10,5 Stunden für den TCR auf der Lymphozytenoberfläche fest. Nach Stimulation des TCR mit Anti-TCR-AK sank die Halbwertszeit auf 3,5 Stunden ab. Von Essen et al. konnten diesen beschleunigten Abbau des TCR auch nach Stimulation von menschlichen

V β 8⁺-Zellen mit Superantigenen nachvollziehen. Dabei zeigte sich eine vollständige Endozytose des TCR-Komplexes. Der Effekt war dosisabhängig und zeigt, dass die Herabregulierung des TCR durch Endozytose erfolgt (Essen et al., 2004). Die Reduktion des TCR an der Lymphozytenoberfläche, um die Sensitivität auf neue Stimulation zu reduzieren, ist als ein sinnvolles Vorgehen des Körpers interpretiert worden, um Autoimmunprozessen vorzubeugen (Niedergang et al., 1995). Naramura et al. zeigten, dass Knock-out-Mäuse ohne die Möglichkeit einer TCR-Herabregulation auf eine Anti-CD3-Stimulation überreagierten und starke Zeichen einer Autoimmunreaktion hatten, welche zum Tod der Mäuse führte (Naramura et al., 2002). Eine erhöhte Anzahl an T-Zell-Rezeptoren führt zu einem erhöhten Level an proapoptotischen Molekülen und zu einem Absinken von antiapoptotischen Molekülen, sodass die Zellen mit höherem TCR-Level anfälliger für Apoptose sind (Bonefeld et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verminderung der Expression an CD3 relativ zu CD4 und CD8 evtl. überschätzt. Dieser Schluss liegt nahe, weil auch nach Injektion des Lösungsmittels NaCl eine verminderte Expression von CD3 relativ zu CD4 und CD8 beobachtet wurde. Demgegenüber wäre aber zu erwarten gewesen, dass die die Summe der CD4- und CD8-positiven Zellen etwa der Zahl an CD3-positiven Zellen entsprochen hätte. Dies war nicht der Fall (vgl. Abb. 24). Am 1. Tag betrug der Anteil der CD3-positiven Lymphozyten weniger als die Hälfte der Summe aus CD4- und CD8-positiven Zellen. An Tag 3 und 10 war der Anteil der CD3-positiven Zellen sogar noch geringer. Insofern ist bei den gp120 injizierten Tieren vermutlich der Effekt der CD3-Depression ebenfalls als überschätzt anzunehmen.

5.4 Vergleich der gp120 induzierten Myositis mit der durch ein konventionelles Antigen induzierten Myositis

Es existiert eine Vielzahl an Modellen für eine Myositis, welche am Tiermodell erzeugt wurde (Katsumata und Ascherman, 2008). Hier soll nur auf die Modelle eingegangen werden, die gut mit der Myositis, welche durch gp120 ausgelöst wurde, vergleichbar sind.

Durch intramuskuläre Injektion von Protein C und Protein-C-Fragment 2 zeigte sich ein endomysiales, von CD8⁺T-Zellen getragenes Entzündungsbild (Kohyama und Matsumoto, 1999; Matsumoto et al., 2007).

Tab.3: Übersicht über Modelle zur Induzierung einer Polymyositis

Arbeit	Antigen	Ergebnis
Kojima et al., 1997	Myosin-Injektion in Lewis-Rattenmuskel	Schwache Myositis
Kohyama und Matsumoto, 1999	C-Protein- Injektion in Lewis-Rattenmuskel	Bild einer Polymyositis
Matsumoto et al., 2007	C-Protein- Fragment- Injektion in Lewis- Rattenmuskel	Bild einer Polymyositis
Sugihara et al., 2007	Injektion von rekombinanten menschlichem C-Protein in Mäuse	Bild einer Polymyositis
Nakano et al., 2005	Laminin- Injektion in Lewis- Ratten	Moderates Bild einer Myositis
Katsumata et al., 2007	Histidyl-tRNA-Injektion in Mäuse	Kombination einer Lungen- und Muskelentzündung
Allenbach et al., 2009	Myosin-Injektion in Mäusemuskel	Polymyositis ähnliches Bild

Kohyama und Matsumoto nehmen an, dass sich die Immunabwehr bei der Polymyositis gegen ein Bestandteil des Muskels und damit gegen ein Autoantigen richtet. Um diesem Verdacht nachzugehen, injizierten sie gereinigtes Protein C in Lewis Ratten und induzierten so eine Entzündung, die der Polymyositis ähnelt. Die durch Protein-C-induzierte Myositis weist eine endomysiale Lymphozytenansammlung auf, von denen der Hauptanteil CD4⁺-Zellen waren. Die in absoluten Zahlen geringeren CD8⁺-Lymphozyten infiltrierten prozentual jedoch vermehrt nicht-nekrotische Muskelfasern. Weiterhin stellten die Autoren fest, dass CD4⁺-Zellen in nur sehr geringer Zahl Muskelfasern infiltrierten, während eine große Anzahl an OX42⁺-Zellen (ein Oberflächenmarker von Makrophagen) sowohl im Endomysium, als auch in den Muskelfasern registriert wurde. Die Invasion von OX42⁺/CD4⁻-Zellen in Muskelzellen ist eher untypisch für die humane Polymyositis. Bei diesen Zellen könnte es sich um eine bisher unbekannte Subpopulation von Makrophagen handeln.

In der Arbeit von Kohyama und Matsumoto wurde Protein C einmal pro Woche über vier Wochen lang intramuskulär injiziert. Die Opferung der Tiere fand eine Woche nach der letzten Injektion statt. Kohyama und Matsumoto kamen zu dem Schluss, dass es sich bei Protein C um das Haupt-myositogene Antigen der Polymyositis handeln könnte (Kohyama und Matsumoto, 1999).

Nach der Injektion von gp120 im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine starke Inflammation mit einem Entzündungsmaximum an Tag 3 festgestellt werden. Der histologische Score zur Bewertung der Muskelzellbeteiligung ist höher als die vergleichbare Entzündung mit

den Antigenen Protein C bzw. Protein-C-Fragment 2. Während nach gp120-Injektion im Muskel eine Entzündung mit stets mehr als 20 involvierten Muskelzellen (Tag 3) und damit einem Score von 3,0 zu sehen war, lag der entsprechende Score bei den Protein-C-injizierten Ratten im Schnitt bei nur 1,41. Dies weist auf eine deutlich stärkere Aktivierung der Immunantwort durch gp120 verglichen mit „konventionellen“ Antigenen, in dem Fall Protein C, hin.

Tab.4: Vergleich der Muskelbeteiligung von der gp120-induzierten Myositis (aus der vorliegenden Arbeit), der C-Protein-induzierten Myositis und der SC2-induzierten Myositis. Ein höherer Score weist auf eine höhere Ausdehnung der Entzündung und eine höhere Beteiligung von Muskelfasern hin.

Tag	NaCl - injizierte Ratten	Gp120 - injizierte Ratten	C- Protein - injizierte Ratten (Kohyama und Matsumoto, 1999)	SC2 - injizierte Ratten (Matsumoto et al., 2007)
1	1,33 ± 1,15	3,00 ± 0,00		
3	1,67 ± 0,58	3,00 ± 0,00		
7			1,44 ± 0,22	1,36 ± 0,18
10	0,5 ± 0,71	2,75 ± 0,50		

(gp: Glykoprotein, NaCl: Natriumchlorid, SC2: Protein C-Fragment 2)

Ein Kritikpunkt an den Arbeiten von Kohyama und Matsumoto ist die Tatsache, dass die von ihnen untersuchten „Auto“- Antigene (Protein C und Protein C-Fragment 2) zwar körpereigen sind, sich jedoch unter normalen Umständen intrazellulär befinden. Werden diese Bestandteile intramuskulär injiziert, so wirken sie wie ein „externes“ Antigen. Die Präsentation von Protein C erfolgt über MHC-I nie als ganzes Protein, sondern nur als Fragment. Eine primäre Reaktion des Körpers auf Protein C oder Protein C-Fragment 2 findet unter physiologischen Umständen daher vor allem nach einem Muskeltrauma mit Zerstörung von Muskelzellen statt. Es ist jedoch nicht bekannt, dass ein Muskeltrauma eine Polymyositis nach sich ziehen würde. Es ist daher bei experimentellen autoimmunen Modellen der Myositis, die sich konventioneller Antigene bedienen, offen, warum die Immuntoleranz bei den betroffenen Individuen durchbrochen wird.

In einer vergleichbaren Arbeit von Allenbach et al. wurde Mäusen eine wiederholte intramuskuläre Injektion von Myosin verabreicht. Die Autoren beschreiben ebenso eine Polymyositis-ähnliche Entzündung (Allenbach et al., 2009). Die Mäuse erhielten, ähnlich wie in der Arbeit von Kohyama und Matsumoto, eine mehrfache Injektion mit dem Antigen. Es wird

beschrieben, dass nach nur einer Injektion von Myosin, eine von vier Mäusen eine Myositis entwickelte (Allenbach et al., 2009).

Im Charakter ähnelt die durch gp120 ausgelöste Inflammation der durch Protein C ausgelösten Entzündung mit endomysialen Lymphozytenansammlungen und Invasion von insbesondere CD8⁺-Lymphozyten in nicht-nekrotische Muskelzellen. Dieser Befund zeigt, dass alternativ zu Protein C als einem möglichen Autoantigen auch andere Pathomechanismen, wie etwa der Beteiligung eines Superantigens in Erwägung gezogen werden müssen. In allen mit gp120-injizierten Ratten konnte nach Einmalinjektion von gp120 eine Myositis induziert werden. Gp120 scheint somit eine höhere Potenz zu haben, eine Myositis zu induzieren als es durch eine Einmalinjektion mit einem konventionellen Antigen, wie etwa Myosin, möglich ist. Zusätzlich benötigt die Induzierung der Myositis durch ein konventionelles Antigen komplettes Freundsches Adjuvans, um die Immuntoleranz zu durchbrechen und eine messbare Immunantwort zu erzeugen (Kohyama und Matsumoto, 1999). Ein derartiges zusätzliches Stimulanz zur Durchbrechung der Immuntoleranz war bei gp120-Injektion nicht notwendig.

5.5 Vergleich der gp120 induzierten Myositis mit der HIV-assoziierten Myositis

Die Myositis, welche bei HIV-positiven Patienten vorkommt, ist meist eine von CD8⁺- und von Makrophagen dominierte Entzündung. Diese Zellen verteilen sich in Nachbarschaft zu und invadieren in nicht nekrotische Muskelzellen, welche MHC-I exprimieren (Johnson et al., 2003). Dies weist morphologische Ähnlichkeiten mit der Polymyositis auf, sodass die Polymyositis im Fall der HIV-Myositis als ähnlich eingestuft wurde (Illa et al., 1991; Johnson et al., 2003). Da die Polymyositis bei Patienten mit und ohne HIV sehr ähnlich ist, wurde in Erwägung gezogen, dass auch die Pathogenese Ähnlichkeiten aufweisen könnte (Illa et al., 1991). Auffällig ist auch eine Häufung von Polymyositiden nach HIV-Infektionen (Gan und Miller, 2011). Immunhistochemisch unterscheidet sich die HIV-assoziierte Myositis nur durch eine signifikante Reduktion von CD4⁺-T-Zellen von der seronegativen Polymyositis. Ein Untergang an CD4⁺-T-Zellen ist bei der HIV-Erkrankung typisch (Glencross und Scott, 2001). Daher ist eine Reduktion der CD4-positiven Zellen bei der HIV-assoziierten Myositis als eine Folge der generellen CD4-Depression im Rahmen der HIV-Infektion zu werten (Illa et al., 1991).

Die durch gp120-induzierte Myositis stellt ebenfalls eine durch zytotoxische T-Zellen hervorgerufene, gegen Muskelzellen gerichtete Entzündung dar. So ist sowohl bei der HIV-assoziierten als auch in der gp120-induzierten Myositis der Hautanteil der die Muskelfasern

invadierenden Zellen CD8-positiv. Anders als bei der HIV-assoziierten Myositis kommen CD4-positive Zellen bei der gp120-induzierten Myositis jedoch in einem hohen und teilweise dominierenden Verhältnis vor. Dieser Befund schließt allerdings eine Rolle von gp120 bei der HIV-Myositis keineswegs aus. Die einmalige Injektion von gp120 in den Muskel eines sonst zuvor gesunden Tieres ist freilich anders zu betrachten als etwa die hypothetische gp120-Expression im Muskel eines bereits einige Zeit zuvor mit HIV-infizierten Individuums. Bei diesem stehen, aufgrund des Mangels, CD4⁺-T-Zellen nicht im gleichen Ausmaß für die Beteiligung an der Myositis zur Verfügung.

Bei HIV gibt es Hinweise, dass Superantigene eine Rolle in der Pathogenese spielen. Die Superantigenaktivität scheint sich dabei sowohl auf B-Zellen, als auch auf T-Zellen zu beziehen (Laurence et al., 1992; Berberian et al., 1993; Gougeon et al., 1993). Auf Grund von selektiven Effekten auf bestimmte V β -Familien wie V β 12/ V β 13 oder V β 21 geht Zoulai davon aus, dass gp120 das wirkende Superantigen sein könnte (Laurence et al., 1992; Jason et al., 1996; Zoulai 2007). Möglicherweise ist an dem Pathomechanismus der HIV-assoziierten Myositis auch ein Superantigen wie gp120 beteiligt. Eine mögliche B-Zellaktivierung im Rahmen der gp120-Myositis konnte hier mangels für die Ratte verfügbarer Antikörper nicht berücksichtigt werden.

5.6 Vergleich der gp120 induzierten Myositis bei der Lewis Ratte mit den humanen Krankheitsbildern der Myositiden

Die idiopathischen inflammatorischen Myositiden sind heterogene Krankheitsbilder, welche eine Muskelschwäche, CK-Erhöhung und Infiltration von Lymphozyten in das Muskelgewebe gemeinsam haben. Bisher gibt es zu der Ätiologie der verschiedenen Unterformen (DM, PM und IBM) lediglich Hypothesen und keine sicher nachgewiesenen Auslöser.

Typisch für die Dermatomyositis ist ein humoral vermittelter vaskulitischer Prozess. In der Muskelbiopsie finden sich Nekrosen von Kapillaren und Muskelzellen, welche gruppenförmig angeordnet sind. Das entzündliche Infiltrat ist perivaskulär angeordnet und von B-Zellen sowie CD4-positiven Zellen dominiert. Charakteristisch sind die C5b9-Komplementablagerungen im Bereich der kleinen Arteriolen und Kapillaren (Dalakas, 2011)

Bei der Einschlusskörperchenmyositis überwiegt eine zelluläre, von CD8⁺-Lymphozyten dominierte Immunantwort mit endomysialen lymphozytären Ansammlungen (Stuhlmüller et al., 2013). Es finden sich Vakuolen, welche einen basophilen Randsaum und eosinophile

Einschlüsse haben und als *rimmed vacuoles* bezeichnet werden. Zusätzlich finden sich filamentäre Einschlüsse in Kern und Zytoplasma (Molnar und Schröder, 1998).

Die Polymyositis zeigt ähnlich wie die Einschlusskörperchenmyositis eine endomysiale Entzündung mit vorwiegend CD4- und CD8-positiven Zellen. Typisch für die PM ist die Invasion von CD8-positiven Zellen in nicht-nekrotische Muskelfasern, welche MHC-I exprimieren (Greenberg, 2009).

In der gp120-induzierten Myositis zeigt sich eine kompakte endomysiale Entzündung. Die Zellen des Infiltrats sind vor allem CD4- und CD8-positiv. Es findet sich keine signifikante Atrophie der Muskelzellen. Hinweise für einen vaskulitischen Prozess, wie einer perivaskulären Lymphozytenansammlung oder Nekrose von Kapillaren, fanden sich nicht. Deutlich zu sehen war die Invasion von CD8- und CD4-positiven Zellen in nicht-nekrotische Muskelzellen.

Tab.5: Muskelbiopsiebefunde bei gp120-induzierter Myositis (aus der vorliegenden Arbeit) Polymyositis, Dermatomyositis und Einschlusskörperchenmyositis (In Anlehnung an Pongratz und Späth, 2003).

Muskelbiopsiebefunde	PM	DM	IBM	gp120
Perimysiale Infiltrate	+	++	+	+
Endomysiale Infiltrate	++	+	++	++
B - Lymphozyten	∅	++	∅	n.b.
CD4 - Lymphozyten	+	++	+	++
CD8 - Lymphozyten	++	+	++	++
Invasion von CD8 - Lymphozyten in nicht nekrotische Muskelfasern	++	∅	+	+
„Rimmed vacuoles“	∅	∅	+	∅

(CD: Cluster of Differentiation, DM: Dermatomyositis, gp: glykoprotein, IBM: Einschlusskörperchenmyositis, n.b.: nicht bestimmt, PM: Polymyositis).

In der Gegenüberstellung der Eigenschaften der Muskelbiopsiebefunde weist die gp120-induzierte Myositis Ähnlichkeiten mit der Polymyositis auf. Diese Ähnlichkeit betrifft unter anderem auch das endomysiale Infiltrat, bestehend aus CD8⁺-T-Lymphozyten und Makrophagen, welche nicht-nekrotische Muskelfasern invadieren (van der Meulen et al., 2003). In Abgrenzung zu der typischen humanen Polymyositis wurde in der durch gp120 ausgelösten Myositis auch eine Invasion von CD4-positiven Zellen in Muskelzellen beobachtet. Die invadierenden CD4-positiven Zellen gehören eventuell einer Makrophagen-Population an, welche bei Lewis-Ratten ebenfalls den CD4-Oberflächenmarker besitzen (Jefferies et al., 1985).

5.7 Pathogenetische Überlegung zur Polymyositis

Die Polymyositis gehört zu den idiopathischen inflammatorischen Myositiden, da ein Auslöser für die Entzündung nicht erkennbar ist. Vieles spricht für eine Immunpathogenese der Polymyositis. Der Umstand, dass CD8⁺-Zellen aktiviert werden und klonal proliferieren, wird als Beleg für eine durch ein Antigen induzierte Immunantwort herangezogen (Greenberg, 2007). Die klonale Expansion einer T-Zelle findet nach dem Zusammentreffen einer Antigen-präsentierenden Zelle mit korrespondierendem TCR statt. Nachdem der Antigen-MHC-Komplex der APC von der T-Zelle erkannt wird, kommt es zur Sekretion von Zytokinen wie IL-2, Tumor-Nekrose-Faktor- α oder Interferon- γ . Dies trägt zur Expansion dieser T-Zelle bei (Jain et al., 1995). Allerdings wurde bislang ein die Immunantwort induzierendes Antigen nicht gefunden.

Viele Autoren postulieren eine Autoimmunreaktion als Ursache der PM. Als möglicher Hinweis, dass sich autoreaktive zytotoxische T-Zellen gegen ein Muskelantigen richten, gilt der Nachweis, dass die CD3-Region der klonal expandierenden T-Zellen konservierte Aminosäuresequenzen besitzt. Dies weist eventuell darauf hin, dass die Proliferation der T-Zellen durch ein bekanntes (Auto-)Antigen unterhalten wird (Bender et al., 1995). Der TCR ist ein Heterodimer bestehend meist aus zwei α - und zwei β -Ketten. Diese Ketten bestehen aus den Untereinheiten V α , J α V β , D β , und J β (Call et al., 2002). Das Antigen wird an derjenigen TCR-Region erkannt und gebunden, die durch das V-J und V-D-J Segment (Elemente der rekombinierbaren Genabschnitte) kodiert wird. Wenn T-Zellen selektiv durch ein bestimmtes Antigen, eventuell ein Autoantigen, rekrutiert werden, so ist die Verwendung der V- und J-Gene begrenzt und die Aminosäuresequenz der CD3-Region konserviert (Dalakas, 1998). Alternativ zu einer durch ein Autoantigen ausgelösten Erkrankung könnten autoimmune Myositiden durch humane endogene Retroviren (HERV) ausgelöste Erkrankungen darstellen. HERVs sind seit sehr langer Zeit in unserem Genom vorhanden (Lander et al., 2001) und werden mit zahlreichen Autoimmun- und Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht (Tugnet et al., 2013; Le Dantec et al., 2015). Eine Reaktion gegen HERV-kodierte Bestandteile würde somit mit dem T-Zellrezeptorkomplex einschließlich CD3 erfolgen, welcher konservierte Aminosäuren besitzt.

Auf Grund einer Assoziation von viralen Infektionen und dem Auftreten der Polymyositis wurde eine virale Ursache der Entstehung bereits diskutiert (Stuhlmüller et al., 2013). Dabei wird ins Feld geführt, dass virale Bestandteile über MHC-I exprimiert und von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden könnten. Die durch CD8⁺-Lymphozyten unterhaltende Reaktion gegen

MHC-I-exprimierende Muskelfasern richtet sich gegen ein intrazellulär prozessiertes Protein. Dieses könnte ein Autoantigen sein oder alternativ ein viraler Bestandteil, der in gleicher Weise über MHC-I präsentiert wird. Jedoch wird eine Persistenz der Viren im Muskelgewebe nicht angenommen, da sich virale RNA nicht regelhaft im Muskel nachweisen lässt (Leff et al., 1992).

Auffällig ist eine hohe Assoziation zwischen einer Epstein-Barr Virus (EBV)-Infektion und dem Auftreten von Polymyositis. Barzilai et al. fanden in ihrer Arbeit einen signifikanten Titerunterschied (IgG und IgM gegen EBV) bei den Polymyositispatienten verglichen mit gesunden Kontrollen, sodass diese Arbeitsgruppe einen Zusammenhang postuliert (Barzilai et al., 2007). Eine Assoziation der Polymyositis mit einer viralen Infektion hält eine Reihe von Autoren aus genannten Gründen für sehr wahrscheinlich (Illa et al., 1991; Barzilai et al., 2007; Stuhlmüller et al., 2013). Die genaue Ursache für eine Polymyositis nach Infektion mit Viren beziehungsweise der Zusammenhang zwischen einer Infektion und dem Auftreten einer PM ist jedoch noch nicht geklärt. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass unter anderem auch Retroviren (HIV, Humanes T-lymphotropes Virus, Simian Betaretrovirus Serotyp 1) als Auslöser einer PM in Frage kommen (Dalakas, 1991; Illa et al., 1991; Saito et al., 2002).

5.8 Pathogenetische Überlegung einer durch humane endogene Retroviren induzierten Myositis als Modell einer Polymyositis

Neben exogenen Retroviren gibt es auch sogenannte endogene Retroviren, die mit einer Vielzahl humaner Krankheiten, wie Diabetes mellitus, Rheumatoider Arthritis oder Multipler Sklerose, in Verbindung gebracht werden (Balada et al., 2010; Tugnet et al., 2013; Emmer et al., 2014). Ähnlich wie exogene Retroviren können endogene Retroviren über *env*-Abschnitte für Hüllproteine kodieren (Weiss, 1996). Es scheint denkbar zu sein, dass derartige Hüllproteine analog zum gp120 superantigene Eigenschaften aufweisen. Die Auslösung einer Myositis durch gp120 in der vorliegenden Arbeit könnte prinzipiell eine Entsprechung bei den endogenen Retroviren haben. Dies setzt voraus, dass endogene Retroviren in einem Organ wie dem Muskel unter bestimmten Umständen abgelesen werden. Eine solche Aktivierung kann im Sinne einer Transaktivierung durch externe Viren erfolgen (Barzilai et al., 2007). Superantigene als Bestandteile von transaktivierten HERV, bieten eine mögliche Erklärung für die Polymyositis. Die vorliegende Arbeit könnte somit ein erstes Modell für die Superantigen-Hypothese darstellen.

Bei dieser Annahme würde also ein im menschlichen Genom integriertes Retrovirus ein Hüllprotein mit superantigenen Eigenschaften kodieren (Meylan et al., 2005; Nellaker et al., 2006). Nach Transaktivierung, etwa nach viralem Infekt z.B. mit EBV, würde dieses HERV-Superantigen als körpereigener Bestandteil über MHC-I CD8⁺-Lymphozyten präsentiert werden. CD8⁺-Zellen, die das Superantigen im Kontext mit MHC-I auf der Oberfläche von Myozyten erkennen, könnten in Muskelzellen invadieren. Wird das Superantigen sezerniert, kann es eine Vielzahl an T-Zellen rekrutieren und eine massive Inflammation auslösen. Diese Hypothese ist daher besonders interessant, da es die Assoziation von externen viralen Infektionen, der Abwesenheit von viraler RNA im Muskel und die Zerstörung von MHC-I-exprimierenden Zellen durch zytotoxische T-Zellen vereint. Somit umfasst die Retrovirus-Superantigen-Hypothese eventuell viel umfangreicher das gesamte Spektrum autoimmuner Myositiden als es bisherige Ansätze vermochten. Für den Phänotyp der Myositis könnten dabei Unterschiede der Eigenschaften von Superantigenen eine Rolle spielen. So gibt es reine T-Zell-Superantigene wie etwa Staphylokokken Enterotoxin A oder reine B-Zell-Superantigene (Staphylokokken Protein A) oder auch Superantigene mit T- und B-Zell-superstimulatorischen Eigenschaften wie das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte gp120.

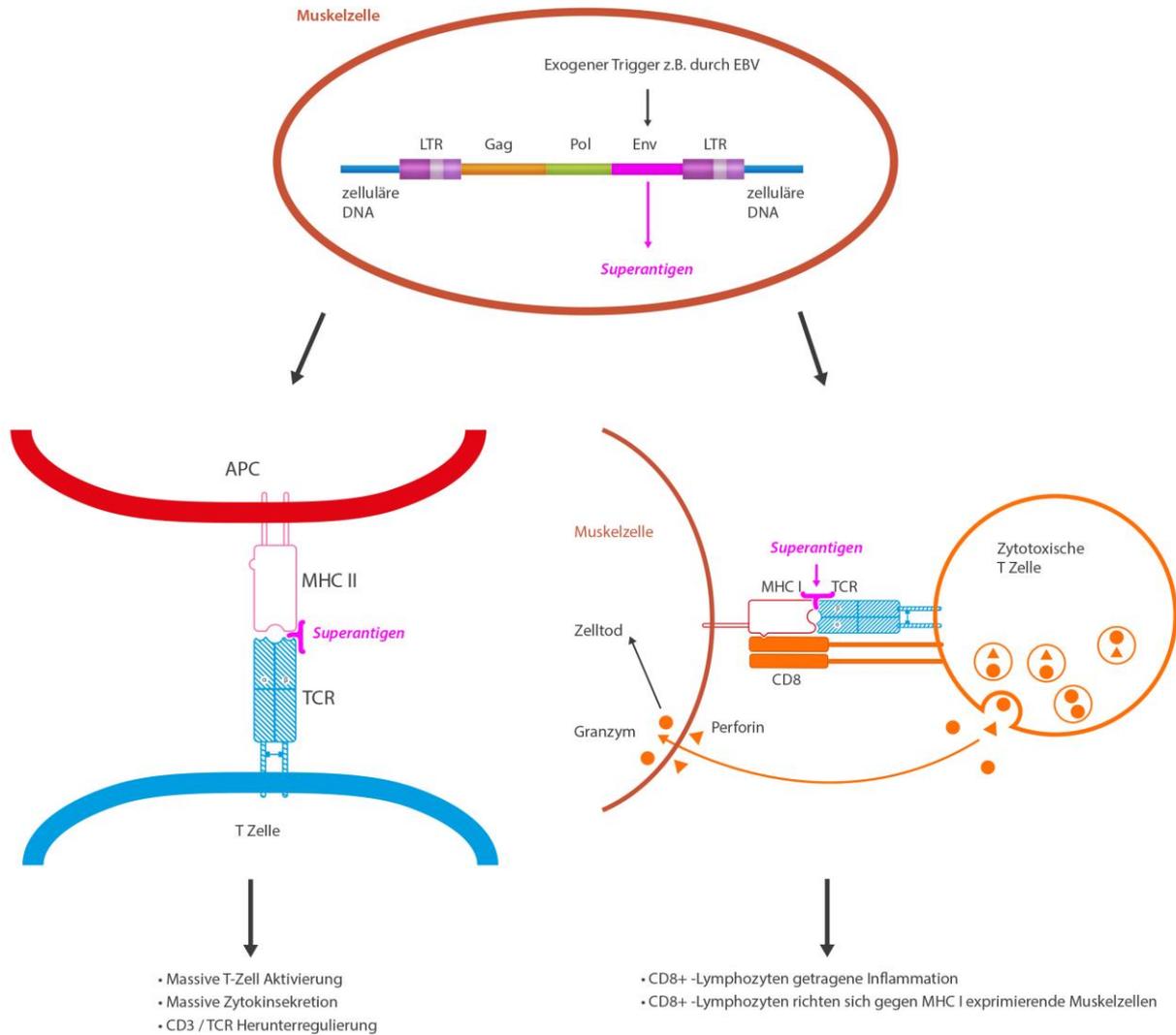


Abb.26: Schematische Darstellung der Retrovirus-Superantigen-Hypothese der Polymyositis. Das durch ein Humanes endogenes Retrovirus kodierte Superantigen könnte nach Transaktivierung durch ein externes Virus sezerniert und Bestandteile über MHC-I-präsentiert werden. Zytotoxische T-Zellen greifen daraufhin die MHC-I-Antigen-Komplex exprimierende Muskelzelle an. Das endogene Superantigen könnte zusätzlich zu einer starken Entzündung mit Aktivierung von CD4-positiven Zellen durch Zytokinsekretion beitragen. Eine CD3-Depression nach Superantigenkontakt ist denkbar. (APC: Antigen präsentierende Zelle, CD: Cluster of Differentiation, DNA: Desoxyribonukleinsäure, env: envelope, Gag: Gen für Gruppenspezifische Antigene, LTR: long terminal repeat, MHC: Major Histocompatibility Complex, Pol: Gen für Polymerasen, TCR: T-Zell-Rezeptor).

5.9 Ausblick

Die Arbeit mit dem Superantigen gp120 lässt folgende Fragen aufkommen, die Inhalt von zukünftigen Studien sein könnten:

1. Wie ist der Zytokin-Verlauf bei der gp120-induzierten Myositis?
2. Wie ist der Zytokin-Verlauf bei der Polymyositis? Gibt es Parallelen zu Superantigen-Reaktionen?
3. Wie reagieren B-Zellen auf das Superantigen gp120?
4. Die Daten der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass gp120 nicht als reines B-Zell-Superantigen aufzufassen ist. Vielmehr liegt neben einer eventuell auch vorhandenen B-Zellstimulation eine erhebliche T-Zellstimulation vor. Diese ist, wie bei T-Zell-Superantigenen bereits bekannt, mit einer verminderten Expression von CD3 auf den beteiligten T-Lymphozyten verbunden. Ist die Wirkung von gp120 auf B- und T-Zellen in anderen Organen ähnlich?
5. Wie verhalten sich die T- und B-Zellen im zeitlichen Verlauf bei persistierenden gp120 Vorkommen?
6. Wenn ein T-Zell Superantigen an der Pathogenese der Polymyositis beteiligt wäre, sollte sich eine verminderte Expression von CD3 relativ zu CD4 beziehungsweise CD8 im Rundzellinfiltrat nachweisen lassen. Umgekehrt wäre ein solcher Befund als starker Hinweis für die Beteiligung eines Superantigens aufzufassen. Wie ist der CD3 Anteil bei Polymyositispatienten im Vergleich zu den CD4- und CD8-positiven Zellen?
7. Bei der Annahme einer Myositis-Auslösung durch Hüllproteine humaner endogener Retroviren liegt es nahe, derartige Hüllproteine einzusetzen, um eine Myositis auszulösen.
8. Eventuell könnten Antikörper gegen HERV-kodierte Hüllproteine gewonnen werden, um nach einer Beteiligung HERV-kodierter Hüllproteine im Rahmen von Myositiden beim Menschen zu fahnden.
9. Sollten sich Hinweise für eine solche Pathogenese finden lassen, könnten entsprechende Antikörper eventuell zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden.

6 Zusammenfassung

Die Gruppe der idiopathischen inflammatorischen Myositiden umfasst die Dermatomyositis, die Polymyositis und die Einschlusskörperchenmyositis. Bislang sind Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankungen nicht bekannt. Tiermodelle konnten bisher keine zufriedenstellende, diese Krankheiten im vollen Ausmaß umfassende Erklärung bieten. Aktuell spiegelt das durch die Arbeitsgruppe um Matsumoto entwickelte Modell einer Polymyositis durch Protein C beziehungsweise durch Protein C-Fragmente am besten eine Autoimmunpathogenese wider. Jedoch erklärt das Modell die Assoziationen der Polymyositis mit anderen Phänomenen, wie den Zusammenhang mit Infektionen, nur unzureichend. Bei den Myositiden spielt eine immunogene Aktivierung eine entscheidende Rolle. In den letzten Jahren sind endogene Retroviren und deren Hüllproteine mit mutmaßlichen superantigenen Eigenschaften zunehmend in den Fokus der Ursachenforschung von bislang ungeklärten Erkrankungen gekommen. Solange derartige Superantigene nicht verfügbar sind, kommen zur Untersuchung einer Superantigen-Pathogenese lediglich kommerziell verfügbare Superantigene zum Einsatz. Als solches ist in der vorliegenden Arbeit gp120 als virales Superantigen eingesetzt worden. Gp120 wurde 13 Lewis-Ratten intramuskulär injiziert. Acht Tiere erhielten eine Lösungsmittelinjektion (NaCl). Es wurde gezeigt, dass durch gp120 ohne weiteres Adjuvans eine massive, endomysial gelegene Entzündung ausgelöst werden kann. Die Entzündung ist von CD4- und CD8-positiven Zellen geprägt, welche vereinzelt in nicht-nekrotische Muskelfasern invadieren. Der CD3-Oberflächenmarker ist bei den Rundzellen im Vergleich zu CD4 beziehungsweise CD8 unterexprimiert. Dieses Phänomen stellt eine typische Reaktion auf einen Superantigenstimulus dar, eventuell um den Organismus vor einer Überstimulation zu schützen. Das Bild der durch gp120 ausgelösten Myositis ähnelt damit dem Bild einer Polymyositis, wie es unter anderem auch gehäuft bei HIV-Infektionen vorkommt. Das Modell der Superantigensynthese durch humane endogene Retroviren stellt eine Möglichkeit dar, sogenannte autoimmune Myositiden sinnvoll zu erklären. Die humanen endogenen Retroviren können durch eine Infektion (z.B. durch EBV) transaktiviert werden und daraufhin Hüllproteine mit Superantigeneigenschaften exprimieren. Superantigene stellen auf Grund ihrer Eigenschaft als potente T-Zell-Stimulatoren einen möglichen Auslöser für autoimmune Myositiden dar. Dies konnte am Beispiel des gp120-Modells der Myositis in der vorliegenden Arbeit deutlich gemacht werden.

7 Literaturverzeichnis

- Acha-Orbea H, Finke D, Attinger A, Schmid S, Wehrli N, Vacheron S, Xenarios I, Scarpellino L, Toellner KM, MacLennan IC, Luther SA (1999) Interplays between mouse mammary tumor virus and the cellular and humoral immune response. *Immunol. Rev.*:287–303.
- Aleksza M, Szegedi A, Antal-Szalmás P, Irinyi B, Gergely L, Panyi A, Hunyadi J, Sipka S, Zeher M, Szegedi G, Dankó K (2005) Altered cytokine expression of peripheral blood lymphocytes in polymyositis and dermatomyositis. *Ann. Rheum. Dis.* 10:1485–1489.
- Allenbach Y, Solly S, Grégoire S, Dubourg O, Salomon B, Butler-Browne G, Musset L, Herson S, Klatzmann D, Benveniste O (2009) Role of regulatory T cells in a new mouse model of experimental autoimmune myositis. *Am. J. Pathol.* 3:989–998.
- Amariglio N, Rechavi G (1996) Do superantigens play a role in lymphoproliferation? *Leuk. Lymphoma* 3-4:237–243.
- Arahata K, Engel AG (1984) 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.* 2:193–208.
- Arahata K, Engel AG (1986) Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. III: Immunoelectron microscopy aspects of cell-mediated muscle fiber injury. *Ann. Neurol.* 2:112–125.
- Balada E, Vilardell-Tarrés M, Ordi-Ros J (2010) Implication of human endogenous retroviruses in the development of autoimmune diseases. *International reviews of immunology* 4:351–370.
- Barzilai O, Sherer Y, Ram M, Izhaky D, Anaya JM, Shoenfeld Y (2007) Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in autoimmune diseases: are they truly notorious? A preliminary report. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*:567–577.
- Behrens L, Kerschensteiner M, Misgeld T, Goebels N, Wekerle H, Hohlfeld R (1998) Human muscle cells express a functional costimulatory molecule distinct from B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) in vitro and in inflammatory lesions. *J. Immunol.* 11:5943–5951.
- Benbassat J, Geffel D, Zlotnick A (1980) Epidemiology of polymyositis-dermatomyositis in Israel, 1960-76. *Isr. J. Med. Sci.* 3:197–200.
- Bender A, Ernst N, Iglesias A, Dornmair K, Wekerle H, Hohlfeld R (1995) T cell receptor repertoire in polymyositis: clonal expansion of autoaggressive CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 5:1863–1868.
- Berberian L, Goodglick L, Kipps TJ, Braun J (1993) Immunoglobulin VH3 gene products: natural ligands for HIV gp120. *Science* 5128:1588–1591.
- Berberian L, Shukla J, Jefferis R, Braun J (1994) Effects of HIV infection on VH3 (D12 idiotope) B cells in vivo. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 7:641–646.
- Betteridge ZE, Gunawardena H, McHugh NJ (2009) Pathogenic mechanisms of disease in myositis: autoantigens as clues. *Curr Opin Rheumatol* 6:604–609.
- Beyenburg S, Zierz S, Jerusalem F (1993) Inclusion body myositis: clinical and histopathological features of 36 patients. *Clin Investig* 5:351–361.
- Billiau A, Matthys P (2001) Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of leukocyte biology* 6:849–860.

- Bohan A, Peter JB (1975) Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 7:344–347.
- Bohan A, Peter JB (1975) Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* 8:403–407.
- Bonefeld CM, Haks M, Nielsen B, Essen M von, Boding L, Hansen AK, Larsen JM, Odum N, Krimpenfort P, Kruisbeek A, Christensen JP, Thomsen AR, Geisler C (2008) TCR down-regulation controls virus-specific CD8+ T cell responses. *J. Immunol.* 11:7786–7799.
- Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW (2002) The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 7:967–979.
- Callan MF, Fazou C, Yang H, Rostron T, Poon K, Hatton C, McMichael AJ (2000) CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo. *J. Clin. Invest.* 10:1251–1261.
- Chirmule N, Kalyanaraman V, Oyaizu N, Pahwa S (1988) Inhibitory influences of envelope glycoproteins of HIV-1 on normal immune responses. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5:425–430.
- Chougnet C, Gessani S (2006) Role of gp120 in dendritic cell dysfunction in HIV infection. *Journal of leukocyte biology* 5:994–1000.
- Dalakas MC (1991) Polymyositis, dermatomyositis and inclusion-body myositis. *N. Engl. J. Med.* 21:1487–1498.
- Dalakas MC (1998) Molecular immunology and genetics of inflammatory muscle diseases. *Arch. Neurol.* 12:1509–1512.
- Dalakas MC (2001) The molecular and cellular pathology of inflammatory muscle diseases. *Curr Opin Pharmacol* 3:300–306.
- Dalakas MC (2011) Review: An update on inflammatory and autoimmune myopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 3:226–242.
- Dalakas MC (2006) Inflammatory, immune, and viral aspects of inclusion-body myositis. *Neurology* 2 Suppl 1:S33-8.
- Dalakas MC, Hohlfeld R (2003) Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 9388:971–982.
- Damle NK, Leytze G, Klussman K, Ledbetter JA (1993) Activation with superantigens induces programmed death in antigen-primed CD4+ class II+ major histocompatibility complex T lymphocytes via a CD11a/CD18-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 7:1513–1522.
- Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, Chien Y (1998) Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.*:523–544.
- DeVere R, Bradley WG (1975) Polymyositis: its presentation, morbidity and mortality. *Brain* 4:637–666.
- Eltzschig HK, Eckle T (2011) Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat. Med.* 11:1391–1401.
- Emmer A, Gerlach K, Staeger MS, Kornhuber ME (2010) T-cell subsets of the encephalitis induced by the superantigen Staphylococcal Enterotoxin A (SEA) in the Lewis rat: an immunohistochemical investigation. *Cell. Immunol.* 1:93–96.
- Emmer A, Staeger MS, Kornhuber ME (2014) The retrovirus/superantigen hypothesis of multiple sclerosis. *Cellular and molecular neurobiology* 8:1087–1096.

- Essen M von, Bonefeld CM, Siersma V, Rasmussen AB, Lauritsen, Jens Peter H, Nielsen BL, Geisler C (2004) Constitutive and ligand-induced TCR degradation. *J. Immunol.* 1:384–393.
- Fathi M, Vikgren J, Boijesen M, Tyles U, Jorfeldt L, Tornling G, Lundberg IE (2008) Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis: longitudinal evaluation by pulmonary function and radiology. *Arthritis Rheum.* 5:677–685.
- Festenstein H (1973) Immunogenetic and biological aspects of in vitro lymphocyte allotransformation (MLR) in the mouse. *Transplantation reviews*:62–88.
- Festenstein H, Kimura S (1988) The Mls system: past and present. *J. Immunogenet.* 1-3:183–196.
- Fields BA, Malchiodi EL, Li H, Ysern X, Stauffacher CV, Schlievert PM, Karjalainen K, Mariuzza RA (1996) Crystal structure of a T-cell receptor beta-chain complexed with a superantigen. *Nature* 6605:188–192.
- Figarella-Branger D, Civatte M, Bartoli C, Pellissier J (2003) Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 6:659–682.
- Gan L, Miller FW (2011) State of the art: what we know about infectious agents and myositis. *Curr Opin Rheumatol* 6:585–594.
- Gao GF, Tormo J, Gerth UC, Wyer JR, McMichael AJ, Stuart DI, Bell JI, Jones EY, Jakobsen BK (1997) Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2. *Nature* 6633:630–634.
- Ghirardello A, Bassi N, Palma L, Borella E, Domeneghetti M, Punzi L, Doria A (2013) Autoantibodies in polymyositis and dermatomyositis. *Curr Rheumatol Rep* 6:335.
- Glencross DK, Scott LE (2001) CD4 cell monitoring for HIV/AIDS: old options; new insights. *SADJ* 12:602–605.
- Göbel TW, Bolliger L (2000) Evolution of the T cell receptor signal transduction units. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*:303–320.
- Goebels N, Michaelis D, Engelhardt M, Huber S, Bender A, Pongratz D, Johnson MA, Wekerle H, Tschopp J, Jenne D, Hohlfield R (1996) Differential expression of perforin in muscle-infiltrating T cells in polymyositis and dermatomyositis. *J. Clin. Invest.* 12:2905–2910.
- Goldrath AW, Bevan MJ (1999) Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 6759:255–262.
- Gougeon ML, Dadaglio G, Garcia S, Müller-Alouf H, Roue R, Montagnier L (1993) Is a dominant superantigen involved in AIDS pathogenesis? *Lancet* 8862:50–51.
- Greenberg SA (2007) Proposed immunologic models of the inflammatory myopathies and potential therapeutic implications. *Neurology* 21:2008–2019.
- Greenberg SA (2009) Inflammatory myopathies: disease mechanisms. *Current opinion in neurology* 5:516–523.
- Greenberg SA, Amato AA (2004) Uncertainties in the pathogenesis of adult dermatomyositis. *Current opinion in neurology* 3:359–364.
- Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM (1991) Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annual review of immunology*:745–772.
- Hohlfield R, Engel AG (1994) The immunobiology of muscle. *Immunology today* 6:269–274.
- Hohlfield R, Engel AG, Goebels N, Behrens L (1997) Cellular immune mechanisms in inflammatory myopathies. *Current opinion in rheumatology* 6:520–526.

- Holguin A, O'Connor KA, Biedenkapp J, Campisi J, Wieseler-Frank J, Milligan ED, Hansen MK, Spataro L, Maksimova E, Bravmann C, Martin D, Fleshner M, Maier SF, Watkins LR (2004) HIV-1 gp120 stimulates proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation via activation of nitric oxide synthase-I (nNOS). *Pain* 3:517–530.
- Holländer G, Gill J, Zuklys S, Iwanami N, Liu C, Takahama Y (2006) Cellular and molecular events during early thymus development. *Immunological reviews*:28–46.
- Huber BT, Hsu PN, Sutkowski N (1996) Virus-encoded superantigens. *Microbiol. Rev.* 3:473–482.
- Huizing M, Krasnewich DM (2009) Hereditary inclusion body myopathy: a decade of progress. *Biochim. Biophys. Acta* 9:881–887.
- Illa I, Nath A, Dalakas M (1991) Immunocytochemical and virological characteristics of HIV-associated inflammatory myopathies: similarities with seronegative polymyositis. *Annals of neurology* 5:474–481.
- Jain J, Loh C, Rao A (1995) Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* 3:333–342.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5. Aufl.: Garland Pub., New York, 2001, S.196.
- Jason J, Inge KL, Orloff SL (1997) HIV antigens and T-cell receptor variable beta chain families. *Scandinavian journal of immunology* 1:81–90.
- Jefferies WA, Green JR, Williams AF (1985) Authentic T helper CD4 (W3/25) antigen on rat peritoneal macrophages. *The Journal of experimental medicine* 1:117–127.
- Johnson RW, Williams FM, Kazi S, Dimachkie MM, Reveille JD (2003) Human immunodeficiency virus-associated polymyositis: a longitudinal study of outcome. *Arthritis and rheumatism* 2:172–178.
- Katsumata Y, Ascherman DP (2008) Animal models in myositis. *Current opinion in rheumatology* 6:681–685.
- Katsumata Y, Harigai M, Sugiura T, Kawamoto M, Kawaguchi Y, Matsumoto Y, Kohyama K, Soejima M, Kamatani N, Hara M (2007) Attenuation of experimental autoimmune myositis by blocking ICOS-ICOS ligand interaction. *J. Immunol.* 6:3772–3779.
- Katsumata Y, Ridgway WM, Oriss T, Gu X, Chin D, Wu Y, Fertig N, Oury T, Vandersteen D, Clemens P, Camacho CJ, Weinberg A, Ascherman DP (2007) Species-specific immune responses generated by histidyl-tRNA synthetase immunization are associated with muscle and lung inflammation. *J. Autoimmun.* 2-3:174–186.
- Kawabe Y, Ochi A (1990) Selective anergy of V beta 8+,CD4+ T cells in Staphylococcus enterotoxin B-primed mice. *The Journal of experimental medicine* 4:1065–1070.
- Kissel JT, Mendell JR, Rammohan KW (1986) Microvascular deposition of complement membrane attack complex in dermatomyositis. *N. Engl. J. Med.* 6:329–334.
- Klausner RD, Samelson LE (1991) T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell* 5:875–878.
- Kohyama K, Matsumoto Y (1999) C-protein in the skeletal muscle induces severe autoimmune polymyositis in Lewis rats. *Journal of neuroimmunology* 2:130–135.
- Kojima T, Tanuma N, Aikawa Y, Shin T, Sasaki A, Matsumoto Y (1997) Myosin-induced autoimmune polymyositis in the rat. *Journal of the neurological sciences* 2:141–148.

- Kronenberg M, Siu G, Hood LE, Shastri N (1986) The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Annual review of immunology*:529–591.
- Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association* Vol. 47, No. 260:583–621.
- Lafferty KJ, Woolnough J (1977) The origin and mechanism of the allograft reaction. *Immunological reviews*:231–262.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, Jong P de, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowski J (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 6822:860–921.
- Lankat-Buttgereit B, Tampé R (1999) The transporter associated with antigen processing TAP: structure and function. *FEBS Lett.* 3:108–112.
- Lappin E, Ferguson AJ (2009) Gram-positive toxic shock syndromes. *The Lancet. Infectious diseases* 5:281–290.
- Laurence J, Hodsieffer AS, Posnett DN (1992) Superantigen implicated in dependence of HIV-1 replication in T cells on TCR V beta expression. *Nature* 6383:255–259.
- Le Dantec C, Vallet S, Brooks WH, Renaudineau Y (2015) Human endogenous retrovirus group E and its involvement in diseases. *Viruses* 3:1238–1257.

- Lee WJ, Kwun HJ, Kim HS, Jang KL (2003) Activation of the human endogenous retrovirus W long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein 1. *Molecules and cells* 1:75–80.
- Leff RL, Love LA, Miller FW, Greenberg SJ, Klein EA, Dalakas MC, Plotz PH (1992) Viruses in idiopathic inflammatory myopathies: absence of candidate viral genomes in muscle. *Lancet* 8803:1192–1195.
- Lundberg IE (2006) The heart in dermatomyositis and polymyositis. *Rheumatology (Oxford)*:iv18-21.
- Mahler M, Miller FW, Fritzler MJ (2014) Idiopathic inflammatory myopathies and the anti-synthetase syndrome: a comprehensive review. *Autoimmunity reviews* 4-5:367–371.
- Malissen B, Ardouin L, Lin SY, Gillet A, Malissen M (1999) Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development. *Adv. Immunol.*:103–148.
- Mann HB, Whitney DR (1947) On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann. Math. Statist. Volume 18, Number 1*:50–60.
- Mantegazza R, Andreetta F, Bernasconi P, Baggi F, Oksenberg JR, Simoncini O, Mora M, Cornelio F, Steinman L (1993) 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.* 6:2880–2886.
- Matsumoto Y, Kohyama K, Park I, Nakajima M, Hiraki K (2007) Characterization of pathogenic T cells and autoantibodies in C-protein-induced autoimmune polymyositis. *Journal of neuroimmunology* 1-2:90–100.
- Medsger TA, Dawson WN, Masi AT (1970) The epidemiology of polymyositis. *Am. J. Med.* 6:715–723.
- Meylan F, Smedt M de, Leclercq G, Plum J, Leupin O, Marguerat S, Conrad B (2005) Negative thymocyte selection to HERV-K18 superantigens in humans. *Blood* 11:4377–4382.
- Molnar M, Schröder JM (1998) Pleomorphic mitochondrial and different filamentous inclusions in inflammatory myopathies associated with mtDNA deletions. *Acta Neuropathol.* 1:41–51.
- Müller S, Köhler H (1997) B cell superantigens in HIV-1 infection. *International reviews of immunology* 4:339–349.
- Murata K, Dalakas MC (1999) Expression of the costimulatory molecule BB-1, the ligands CTLA-4 and CD28, and their mRNA in inflammatory myopathies. *The American journal of pathology* 2:453–460.
- Nakano J, Yoshimura T, Okita M, Motomura M, Kamei S, Matsuo H, Eguchi K (2005) Laminin-induced autoimmune myositis in rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 9:790–796.
- Naramura M, Jang I, Kole H, Huang F, Haines D, Gu H (2002) c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat. Immunol.* 12:1192–1199.
- Nellåker C, Yao Y, Jones-Brando L, Mallet F, Yolken RH, Karlsson H (2006) Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection. *Retrovirology*:44.
- Niedergang F, Hémar A, Hewitt CR, Owen MJ, Dautry-Varsat A, Alcover A (1995) The *Staphylococcus aureus* enterotoxin B superantigen induces specific T cell receptor down-regulation by increasing its internalization. *J. Biol. Chem.* 21:12839–12845.

- Page G, Sattler A, Kersten S, Thiel A, Radbruch A, Miossec P (2004) Plasma cell-like morphology of Th1-cytokine-producing cells associated with the loss of CD3 expression. *Am. J. Pathol.* 2:409–417.
- Palù G, Benetti L, Calistri A (2001) Molecular basis of the interactions between herpes simplex viruses and HIV-1. *Herpes* 2:50–55.
- Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, Borrow P, Saag MS, Shaw GM, Sekaly RP (1994) Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* 6489:463–467.
- Pieters J (2000) MHC class II-restricted antigen processing and presentation. *Adv. Immunol.*:159–208.
- Pongratz D und Späth D: Entzündliche Muskelkrankheiten. In: Pongratz D, Zierz S (Hrsg): Neuromuskuläre Erkrankungen: Diagnostik, interdisziplinäre Therapie und Selbsthilfe. Dt. Ärzte-Verl., Köln, 2003, S 141.
- Saito M, Higuchi I, Saito A, Izumo S, Usuku K, Bangham, Charles R M, Osame M (2002) Molecular analysis of T cell clonotypes in muscle-infiltrating lymphocytes from patients with human T lymphotropic virus type 1 polymyositis. *J. Infect. Dis.* 9:1231–1241.
- Salajegheh M, Pinkus JL, Amato AA, Morehouse C, Jallal B, Yao Y, Greenberg SA (2010) Permissive environment for B-cell maturation in myositis muscle in the absence of B-cell follicles. *Muscle Nerve* 4:576–583.
- Santmyire-Rosenberger B, Dugan EM (2003) Skin involvement in dermatomyositis. *Curr Opin Rheumatol* 6:714–722.
- Schoeniger-Skinner DK, Ledebner A, Frank MG, Milligan ED, Poole S, Martin D, Maier SF, Watkins LR (2007) Interleukin-6 mediates low-threshold mechanical allodynia induced by intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Brain Behav. Immun.* 5:660–667.
- Schön U, Seifarth W, Baust C, Hohenadl C, Erfle V, Leib-Mösch C (2001) Cell type-specific expression and promoter activity of human endogenous retroviral long terminal repeats. *Virology* 1:280–291.
- Shah A, Kumar A (2010) HIV-1 gp120-mediated increases in IL-8 production in astrocytes are mediated through the NF- κ B pathway and can be silenced by gp120-specific siRNA. *J Neuroinflammation*:96.
- Shah A, Verma AS, Patel KH, Noel R, Rivera-Amill V, Silverstein PS, Chaudhary S, Bhat HK, Stamatatos L, Singh DP, Buch S, Kumar A (2011) HIV-1 gp120 induces expression of IL-6 through a nuclear factor-kappa B-dependent mechanism: suppression by gp120 specific small interfering RNA. *PLoS ONE* 6:e21261.
- Silberman SL, Goldman SJ, Mitchell DB, Tong AT, Rosenstein Y, Diamond DC, Finberg RW, Schreiber SL, Burakoff SJ (1991) The interaction of CD4 with HIV-1 gp120. *Semin. Immunol.* 3:187–192.
- Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, Ucla C, Sutkowski N, Huber B, Pelet T, Conrad B (2001) Interferon-alpha-induced endogenous superantigen. a model linking environment and autoimmunity. *Immunity* 4:591–601.
- Stuhlmüller B, Feist E, Häupl T, Burmester G, Pipitone N (2013) Neues zur Pathogenese der Myositiden. *Z Rheumatol* 3:209–219.
- Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT (2001) Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity* 4:579–589.

- Sverdlov ED (2000) Retroviruses and primate evolution. *Bioessays* 2:161–171.
- Torres BA, Kominsky S, Perrin GQ, Hobeika AC, Johnson HM (2001) Superantigens: the good, the bad, and the ugly. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 3:164–176.
- Torres BA, Perrin GQ, Mujtaba MG, Subramaniam PS, Anderson AK, Johnson HM (2002) Superantigen enhancement of specific immunity: antibody production and signaling pathways. *J. Immunol.* 6:2907–2914.
- Townsley-Fuchs J, Neshat MS, Margolin DH, Braun J, Goodglick L (1997) HIV-1 gp120: a novel viral B cell superantigen. *Int. Rev. Immunol.* 4:325–338.
- Trimble LA, Lieberman J (1998) Circulating CD8 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals have impaired function and downmodulate CD3 zeta, the signaling chain of the T-cell receptor complex. *Blood* 2:585–594.
- Tugnet N, Rylance P, Roden D, Trela M, Nelson P (2013) Human Endogenous Retroviruses (HERVs) and Autoimmune Rheumatic Disease: Is There a Link? *Open Rheumatol J*:13–21.
- Turcanova VL, Bundgaard B, Höllsberg P (2009) Human herpesvirus-6B induces expression of the human endogenous retrovirus K18-encoded superantigen. *J. Clin. Virol.* 1:15–19.
- van der Meulen, M F G, Bronner IM, Hoogendijk JE, Burger H, van Venrooij, W J, Voskuyl AE, Dinant HJ, Linssen, W H J P, Wokke, J H J, Visser M de (2003) Polymyositis: an overdiagnosed entity. *Neurology* 3:316–321.
- Varmus H (1988) Retroviruses. *Science* 4858:1427–1435.
- Waschbisch A, Wintterle S, Lochmüller H, Walter MC, Wischhusen J, Kieseier BC, Wiendl H (2008) Human muscle cells express the costimulatory molecule B7-H3, which modulates muscle-immune interactions. *Arthritis Rheum.* 11:3600–3608.
- Weinhold KJ, Lyerly HK, Stanley SD, Austin AA, Matthews TJ, Bolognesi DP (1989) HIV-1 GP120-mediated immune suppression and lymphocyte destruction in the absence of viral infection. *J. Immunol.* 9:3091–3097.
- Wiendl H (2008) Idiopathic inflammatory myopathies: current and future therapeutic options. *Neurotherapeutics* 4:548–557.
- Wiendl H, Hohlfeld R, Kieseier BC (2005) Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. *Trends Immunol.* 7:373–380.
- Wiendl H, Lautwein A, Mitsdörffer M, Krause S, Erfurth S, Wienhold W, Morgalla M, Weber E, Overkleeft HS, Lochmüller H, Melms A, Tolosa E, Driessen C (2003) Antigen processing and presentation in human muscle: cathepsin S is critical for MHC class II expression and upregulated in inflammatory myopathies. *J. Neuroimmunol.* 1-2:132–143.
- Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, Melms A, Lochmuller H, Hohlfeld R, Weller M (2003) Muscle fibres and cultured muscle cells express the B7.1/2-related inducible co-stimulatory molecule, ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain Pt* 5:1026–1035.
- Wu H, Kwong PD, Hendrickson WA (1997) Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* 6632:527–530.
- Wucherpfennig KW (2001) Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J. Clin. Invest.* 8:1097–1104.
- Xu SX, McCormick JK (2012) Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol*:52.

Zagury JF, Bernard J, Achour A, Astgen A, Lachgar A, Fall L, Carelli C, Issing W, Mbika JP, Picard O (1993) Identification of CD4 and major histocompatibility complex functional peptide sites and their homology with oligopeptides from human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120: role in AIDS pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 16:7573–7577.

Zamoyska R (1998) CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr. Opin. Immunol.* 1:82–87.

Zehn D, King C, Bevan MJ, Palmer E (2012) TCR signaling requirements for activating T cells and for generating memory. *Cell. Mol. Life Sci.* 10:1565–1575.

Zierz S: Normale Anatomie der Skelettmuskulatur. In: Zierz S, Jerusalem F (Hrsg): *Muskelerkrankungen*. 3.Aufl. Thieme, Stuttgart, 2003, S. 12.

Zouali M (2007) Exploitation of host signaling pathways by B cell superantigens--potential strategies for developing targeted therapies in systemic autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*:342–354.

8 Thesen

1. Autoimmun bedingte Myositiden sind seltene entzündliche Muskelerkrankungen (insbesondere Polymyositis, Dermatomyositis, Einschlusskörperchenmyositis). Die Ursache der autoimmun bedingten Myositiden ist bisher unbekannt. Es existieren bereits mehrere Tiermodelle für die experimentelle autoimmune Myositis (EAM). Bislang sind z.B. Myosin und Protein C als Auslöser einer autoimmunen Myositis in Betracht gezogen worden. Daneben wurde über die Rolle von Retroviren im Rahmen der Pathogenese autoimmun bedingter Myositiden spekuliert.
2. In jüngster Zeit rücken zunehmend humane endogene Retroviren (HERV) im Zusammenhang mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen wie etwa Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis in das Blickfeld. HERV kodieren über env-Segmente für Hüllproteine. Solche Hüllproteine können stark immunstimulierende Eigenschaften besitzen und somit als Superantigene fungieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das Hüllprotein gp120 des HI-Virus eine Entzündung im Muskel induzieren kann.
3. Nach intramuskulärer Injektion von 50 µl gp120 (0,5mg/ml) konnte im Unterschied zur Injektion von 0,9% NaCl als Kontrolle im M. quadrizeps der Lewis-Ratte eine muskuläre Entzündung induziert werden. Die Inflammation wurde an Tag 1, Tag 3 sowie 10 Tagen nach Injektion bewertet. Die Entzündung wurde mit HE-Färbung sowie immunhistochemisch mit Antikörpern gegen die Antigene CD3, CD4 und CD8 untersucht.
4. Das entzündliche Infiltrat war am 3. Tag nach gp120-Injektion maximal ausgeprägt und wies eine vorwiegend endomysiale Verteilung auf. Es fanden sich dabei etwas mehr CD4⁺-Lymphozyten als CD8⁺-Lymphozyten. Unter anderem wurde dabei die Invasion von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in nicht-nekrotische Muskelfasern dokumentiert.
5. Der Charakter der durch gp120 ausgelösten Entzündung ähnelt am ehesten der einer Polymyositis. Da gp120 ein virales Superantigen ist, liegt es nahe, dass virale Superantigene bei der Entstehung einer Polymyositis beteiligt sein könnten.
6. Bei autoimmunen Myositiden kommen als Quelle für Superantigene am ehesten HERV in Betracht. Darüber hinaus könnten Superantigene bei viral oder bakteriell bedingten Myositiden eine Rolle spielen.

7. Die vorliegende Untersuchung kann als Ausgangspunkt dienen, um die Rolle HERV-kodierter Superantigene bei Polymyositis, Dermatomyositis und Einschlusskörperchenmyositis zu untersuchen.

9. Anlagen

Lebenslauf

Zur Person:

Name: Susanne Hirsch
Geboren am: 24.08.1986
Geburtsort: Halle /Saale
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1997-2006 Giebichensteingymnasium in Halle, Abschluss: Abitur

Studium:

2006-2012 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Humanmedizin

Beruflicher Werdegang:

2013/14 Assistenzärztin der Klinik und Poliklinik für Neurologie (UKK, Halle)
seit April 2014 Assistenzärztin der Klinik für Neurologie (Klinikum St. Georg, Leipzig)

Sprachen:

Deutsch (Muttersprache)
Englisch (CEF-Niveau B2)
Französisch (CEF-Niveau A1)

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.

Leipzig, den

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Leipzig, den

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß §16 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Leipzig, den

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. Zierz möchte ich dafür danken, dass ich an der von ihm geleiteten Klinik im Muskellabor meine Dissertation erstellen durfte. Mein Dank für die fortwährende, geduldige Unterstützung und Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten gilt Herrn Prof. Dr. Kornhuber und Herrn Dr. Emmer.

Neben meiner Familie, die in jeglicher Hinsicht die Grundlage für meinen Weg gelegt haben, möchte ich mich bei meinen Freunden für den Rückhalt bedanken. Und ich bedanke mich bei Sven Kalbitz, der mich in allen Phasen begleitete und unterstützte.