

**Die morphologische Analyse von Muskelbiopsien als Teil der integrativen
Klassifizierung und Diagnostik von juvenilen inflammatorischen Myopathien**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Rager, Leonie Josephine
aus Dresden

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Neuropathologie

Gutachterin: Prof. Dr. med. Anne Schänzer

Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Neubauer

Tag der Disputation: 01.11.2023

Hinweis Gendersprache

Diese Arbeit wurde, um eine sprachliche Gleichbehandlung aller Geschlechter auszudrücken, in einer gendergerechten Sprache verfasst. So wurde bei einer Gruppe von Personen versucht, durch das Anfügen eines Gendersternchens und der femininen Bezeichnung **innen*; männliche, weibliche, nichtbinäre und diversgeschlechtliche Personen zu inkludieren. Fallbeispiele von einzelnen Patient*innen wurden aus Gründen der Einfachheit und besseren Lesbarkeit mit dem biologischen Geschlecht beschrieben, mit der Rücksicht und dem Respekt, dass das biologische Geschlecht nicht die wahre Geschlechtsidentität aller Personen ausdrückt.

1	Einleitung.....	1
1.1	Myopathie und Myositis – Was ist das?.....	1
1.2	Bedeutung und Entwicklung einer Klassifizierung von idiopathisch inflammatorischen Myopathien.....	1
1.3	Die integrative Diagnose der idiopathisch inflammatorischen Myopathien im Kindes- und Erwachsenenalter	5
1.3.1	Myositis-spezifische-Autoantikörper	8
1.4	Die Dermatomyositis	10
1.5	Das Antisynthetasesyndrom	12
1.6	Die Overlapmyositis	12
1.7	Die immunvermittelte nekrotisierende Myopathie.....	12
1.8	Die Muskelpathologie als wichtiger Baustein bei der integrativen Diagnose einer Myositis	13
1.9	Prognose und Therapiemöglichkeiten von IIM.....	17
1.10	Fragestellung	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Materialliste	20
2.2	Untersuchungskohorte und Probengewinnung.....	20
2.2.1	Juvenile Patient*innen mit klinischer Diagnose einer Myositis	20
2.2.2	Proband*innen ohne pathologische Muskelbiopsie (Kontrollgruppe).....	21
2.2.3	Ethikvotum	22
2.2.4	Durchführung der Muskelbiopsie.....	22
2.2.5	Weiterverarbeitung der Proben zu Kryostatschnitten	22
2.2.6	Fixierung und Weiterverarbeitung der Proben zur ultrastrukturellen Analyse (Transmissions-Elektronenmikroskopie=TEM)	22
2.3	Histologische Färbungen	24
2.3.1	Standard- und Enzymfärbungen am Muskel.....	24
2.3.2	Immunhistochemie	27
2.3.3	Auswertung der Standardfärbungen, Enzymhistochemie und Immunhistochemie.....	29
2.3.4	Ultrastrukturelle Auswertung.....	33
2.4	Statistische Auswertung	35

3	Ergebnisteil	36
3.1	Klinische Ergebnisse	36
3.1.1	Klinische Symptomatik der Patient*innen	36
3.1.2	Muskelbiopsie	39
3.1.3	Laborparameter	40
3.1.4	Apparative Diagnostik bei Patient*innen mit jIIM	41
3.1.5	Analyse der Serumantikörper bei Patient*innen mit jIIM	42
3.2	Muskelpathologie bei Patienten mit jIIM	54
3.2.1	Auswertung der histomorphologischen Veränderungen und Entzündungszeichen	54
3.2.2	Statistische Auswertung des VAS-Score	55
3.2.3	COX-negative Fasern als distinkte Pathologie bei jDM	58
3.2.4	Hochregulation der perimysialen alkalischen Phosphatase (ALP) war spezifisch für Anti-Jo1-ASyS	58
3.2.5	Muskelfaserdestruktion und Regeneration zeigt sich in allen Subtypen von jIIM mit einer stärkeren pathologischen Ausprägung in jDM und Anti-Jo-1-ASyS... 63	
3.2.6	Sarkolemmale Expression von Komplementablagerungen (c5b-9), MHC I und MHC II	65
3.2.7	Muskelbiopsien mit höherem VAS-Score zeigen eine erhöhte Autophagie 66	
3.2.8	Vaskuläre Pathologie, Hochregulation von proangiogenen VEGF als Hypoxiemarker und Muskelfaserregeneration bei jIIM	67
3.2.9	Eine Überexpression des Interferon-1-induzierenden (IFN1) Ersatzmarkers Myxovirus resistance protein A (MxA) geht mit endothelialen Einschlüssen bei jDM und Anti-Jo1-ASyS einher	68
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	75
4	Diskussion	77
4.1	Diskussion	77
4.2	Klinische Befunde der IIM im Kindesalter im Vergleich zum Erwachsenenalter	77

4.3	Die Bedeutung der Myositis-spezifischen Autoantikörper für die Diagnose einer IIM	79
4.4	Morphologische Charakteristika in der Skelettmuskulatur bei juveniler Myositis	80
4.5	Die Bedeutung von Myxoprotein A und die Regulation von Interferon bei jDM und ASyS	81
4.6	Veränderungen der endomysialen Gefäße als wichtige Komponente in der Pathogenese von jDM	82
4.7	COX-negative Fasern in jDM-Biopsien als Marker für eine Störung der OXPHOS	84
4.8	Eine Hochregulation von p62 und LC3 kann auf einen Pathomechanismus durch Störung der Autophagie hinweisen	85
4.9	Morphologische und klinische Merkmale des Antisynthetasesyndroms	86
4.10	Overlapmyositis	87
4.11	Diskussion der Methoden und Limitationen der Studie	89
4.12	Fazit und Ausblick	91
5	Zusammenfassung	93
6	Summary	94
7	Abkürzungsverzeichnis	95
8	Abbildungsverzeichnis	99
9	Tabellenverzeichnis	101
10	Anhang	103
10.1	Geräte, Software und Verbrauchsmaterial	103
10.2	Zusammensetzung der Gebrauchslösungen	107
10.3	Färbeprotokolle	109
11	Literaturverzeichnis	115
12	Publikationsverzeichnis	123
13	Ehrenwörtliche Erklärung	149
14	Danksagung	150

1 Einleitung

1.1 Myopathie und Myositis – Was ist das?

Störungen im Aufbau der Skelettmuskulatur können zu einem Funktionsverlust der Muskulatur führen und Ursachen verschiedener Muskelerkrankungen sein. Solche Erkrankungen der Skelettmuskulatur werden als Myopathien bezeichnet (griech. Muskelleiden). Myopathien sind sehr selten und gehören zu den sogenannten *rare diseases* (Gehlen/Delank, 2010, S.469; Stenzel et al., 2021). *Rare diseases* sind individuell selten, betreffen aber insgesamt einen erheblichen Teil der Bevölkerung (Ferreira, 2019). Häufig sind Kinder von seltenen Krankheiten betroffen, die meistens eine genetische Ursache haben (Wright/Fitzpatrick/Firth, 2018). Oft existieren nur wenige medizinische Veröffentlichungen und es herrscht Uneinigkeit über genaue Zahlen (Ferreira, 2019). Ein besseres Verständnis für seltene Erkrankungen bildet die Grundlage für genaue Prognosen und unterstützt die Forschung nach neuen Therapien (Wright/Fitzpatrick/Firth, 2018).

Unter dem Begriff einer Myositis wird eine heterogene Krankheitsgruppe von erworbenen entzündlichen Myopathien zusammengefasst (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022). Klinisch besteht anfänglich oft ein herabgesetzter Allgemeinzustand, Myalgien, Schwellung, Muskelschwäche und gelegentlich auch Fieber (Crum-Cianflone, 2008; Gehlen/Delank, 2010, S.485). Prognostisch führt v.a. eine Beteiligung von extramuskulären Organen zu einer progredienten Bewegungseinschränkung und einer erhöhten Morbidität. Man unterscheidet autoimmune (z.B. der Dermatomyositis) von erregerbedingten Myositiden (viral, bakteriell, parasitär, mykotisch). (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022)

Diese Arbeit setzt ihren Fokus auf die Untersuchung von idiopathisch inflammatorischen Myopathien (IIM) im Kindesalter.

1.2 Bedeutung und Entwicklung einer Klassifizierung von idiopathisch inflammatorischen Myopathien

Die IIM bilden die größte Gruppe von erworbenen und potenziell behandelbaren Erkrankungen des Bewegungsapparats (Dalakas, 2015). Die Inzidenzen aus europäischen, nordamerikanischen und asiatischen Studien reichen von 1,16 bis 790 Patient*innen pro eine Million Personenjahre und zeigen Prävalenzen zwischen 2,4 und 33,8 pro 100.000 Personen (Barnabe et al., 2012; Bernatsky et al., 2009; Dobloug et al.,

2015; Furst et al., 2012; Meyer et al., 2015; Oddis et al., 1990; Svensson et al., 2017; Yu et al., 2013). In der Regel sind mehr Frauen als Männer betroffen, ausgenommen bei der Einschlusskörperchenmyositis, die häufiger das männliche Geschlecht betrifft (Dalakas/Irlbacher, 2016; Lundberg et al., 2021).

Tab. 1: Häufigkeit von IIM-Subtypen im Kindes- und Erwachsenenalter

IIM	Häufigkeit	
	adult	juvenil
DM	13,8-28 %	81,2-85 %
ASyS	9-40 %	5-12 %
OM	12,6-49 %	6-11 %
IMNM	~ 25 %	selten, <3 %
IBM	~ 16 %	-

Erklärung: Die Häufigkeiten spiegeln den Streuungsbereich verschiedener Publikationen wider. Zudem zählen manche Publikationen das ASyS zur OM und weitere verwenden den Subtyp der PM, was bei der Interpretation dieser Werte berücksichtigt werden muss. (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022; Meyer et al., 2015; Naveen et al., 2021; Rider/Nistala, 2016; Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013; Watanabe et al., 2016; Wu/Lu/Reed, 2020) ASyS=Antisynthetasesyndrom, DM=Dermatomyositis, IBM=Einschlusskörperchenmyositis, IIM=idiopathisch inflammatorische Myopathien, IMNM=Immunvermittelte nekrotisierende Myopathie, PM=Polymyositis, OM=Overlapmyositis

Die juvenile IIM (jIIM) ist im Vergleich zu den sowieso schon seltenen adulten inflammatorischen Myopathien (aIIM), noch deutlich seltener mit einer Inzidenz von etwa 1,6 bis 4,0 Millionen Personenjahre (Meyer et al., 2015; Stenzel et al., 2021). Geschätzt liegt deren Prävalenz bei circa einem Fünftel im Vergleich zu den adulten Formen (Rider/Nistala, 2016). Beispielsweise weist die juvenile Dermatomyositis (jDM), als häufigste Form der juvenilen IIM, eine Inzidenz von etwa zwei bis vier Fällen auf eine Million Kinder und Jugendlichen pro Jahr auf, mit Unterschieden zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen (Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013; Wedderburn/Rider, 2009; Wu/Lu/Reed, 2020). Ähnlich der erwachsenen Formen, handelt es sich bei den jIIM um eine heterogene Gruppe von seltenen systemischen

Autoimmunerkrankungen, die sich durch eine Muskelschwäche, eine chronische Entzündung des Skelettmuskels und einem vielfältigen Bild von klinischen Begleitsymptomen charakterisieren (Rider/Nistala, 2016). Trotz vieler Gemeinsamkeiten sollten die juvenilen Formen als eigene Entität von den adulten IIM abgegrenzt werden (Stenzel et al., 2021).

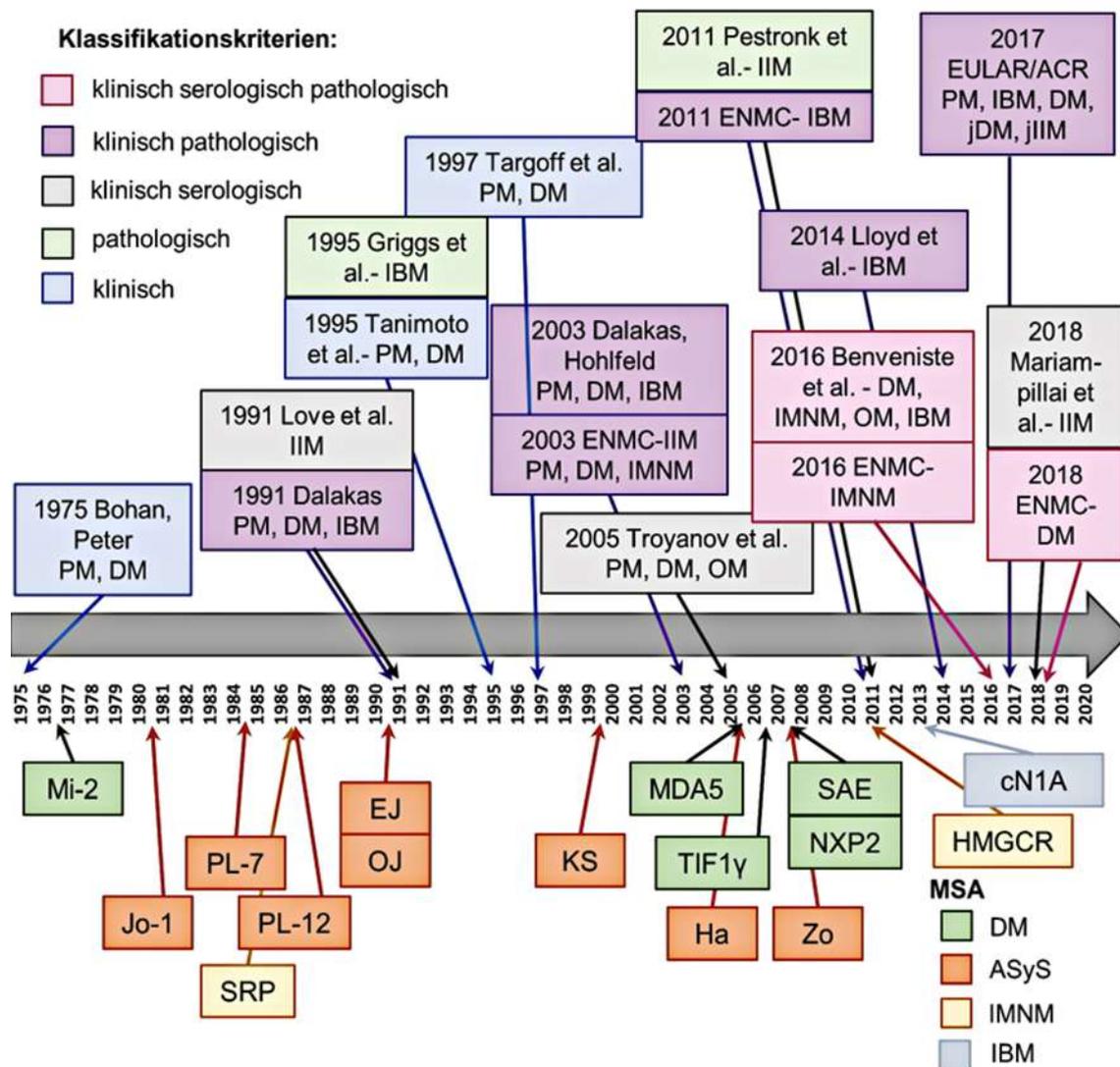


Abb. 1: Die Historische Entwicklung der IIM-Klassifikation Die Entwicklung einer Klassifikation der IIM und die Entdeckung von Myositis-spezifischen-Antikörpern (MSA) in chronologischer Reihenfolge. Eigene Abbildung orientiert an Tanboon et al. 2020. ACR=American College of Rheumatology, DM=Dermatomyositis, ENMC=European Neuromuscular Centre, EULAR= European League against Rheumatism, IBM=Einschlusskörperchenmyositis, IIM=idiopathisch inflammatorische Myopathie, IMNM=Immunvermittelte nekrotisierende Myopathie, jDM=juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch inflammatorische Myopathie, OM=Overlapmyositis, PM=Polymyositis

Die IIM werden in Subgruppen unterteilt. Man unterscheidet bei erwachsenen Patient*innen Dermatomyositis (DM), Einschlusskörperchenmyositis (*Inclusion Body Myositis*; IBM), immunvermittelte nekrotisierende Myopathie (*Immune-mediated necrotizing myopathy*; IMNM) und das Antisynthetasesyndrom (ASyS) (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S.479; Tanboon et al., 2020). Zusätzlich kann eine immunologisch entzündliche Myopathie auch als Begleitmyositis von Kollagenosen und anderen Systemerkrankungen, sowie Autoimmunerkrankungen auftreten. Diese Art von Myositis gilt als eigene Entität und wird aufgrund ihrer stark überlappenden klinischen und morphologischen Merkmale als *Overlapmyositis* (OM) bezeichnet. (Aguila et al., 2014; Damoiseaux et al., 2022; Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S.479; Lundberg et al., 2021). In der Literatur wird anhaltend diskutiert, ob man das ASyS als eigene Entität wahrnehmen soll oder es zu der DM oder der heterogenen Gruppe der OM zählen sollte (Damoiseaux et al., 2022; Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022; Fredi/Cavazzana/Franceschini, 2018). Historisch gesehen wurde die Gruppe der entzündlichen Myopathien früher durch den Begriff der DM und Polymyositis (PM) nach Bohan und Peter 1975 zusammengefasst (Abb. 1) (Bohan/Peter, 1975). Diese Einteilung konnte durch klinische, histopathologische Erkenntnisse und die Entdeckung von Autoantikörpern (AK), in genauere Untergruppen des Erkrankungsbildes durch spezifische Merkmale charakterisiert werden (Allenbach et al., 2017; Dalakas, 2015; Lundberg et al., 2021; Tanboon et al., 2020). In der neueren Literatur und Expertenempfehlungen wird die Bezeichnung PM weiterhin diskutiert, da man diese Fälle häufig in die Gruppe der OM einordnet, von dieser Diagnose gänzlich abweicht oder gelegentlich sogar als „obsolet“ bezeichnet (Bronner et al., 2004; Damoiseaux et al., 2022; Vilela et al., 2015). Im Gegensatz zu den aIIM unterscheidet sich die Klassifikation der jIIM in die Subtypisierung der jDM, dem ASyS, der OM und in sehr seltenen Fällen der IMNM (Della Marina et al., 2021; Stenzel et al., 2021). Trotz vereinzelter Fallbeschreibungen gilt es heutzutage als allgemeiner Konsens, dass die klassische IBM nicht unter dem Alter von 45 bis 50 Jahren auftritt (Damoiseaux et al., 2022; Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022; Stenzel et al., 2021). Die Klassifizierung der IIM entwickelt sich stetig weiter und distinkte Charakteristika für genauere Subgruppen werden anhaltend diskutiert (Abb. 1). Eine standardisierte Einteilung der IIM durch validierte Untersuchungen ist entscheidend zur Beurteilung der bestmöglichen Therapie und Prognose für die einzelne Patientin/ den einzelnen Patienten. (Allenbach et al., 2017; Benveniste/Goebel/Stenzel, 2019; De Bleecker et al., 2015; Patwardhan/Spencer, 2021)

In dieser Arbeit wird das ASyS als eigene Entität betrachtet und nicht als Teil der DM oder OM. Außerdem wird aufgrund der widersprüchlichen Ansichten zur PM in der Literatur dieser Subtyp nicht weiter ausgeführt. Da diese Arbeit sich mit Patient*innen im Kindesalter beschäftigt, wird auf eine genaue Darstellung der bei adulten Patient*innen vorkommenden IBM verzichtet, mit dem Verweis auf weiterführende Literatur (siehe Catalán/Selva-O'Callaghan/Grau, 2014; Dalakas, 2015; Lucchini et al., 2021). Eine detaillierte Vorstellung der juvenilen Entitäten der IIM ist unten aufgeführt.

1.3 Die integrative Diagnose der idiopathisch inflammatorischen Myopathien im Kindes- und Erwachsenenalter

Expertenempfehlungen zur Diagnostik von IIM beruhend auf aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen, z.B. vom *European Neuromuscular Centre* (ENMC) (Damoiseaux et al., 2022; De Bleecker et al., 2015; Mammen et al., 2020) und/oder der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) in der Leitlinie „Myositissyndrome“ (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022), können die Entscheidungsfindung im klinischen Alltag erleichtern. Dazu zählen u.a. die Anamnese (v.a. das Erfragen von extramuskulären Symptomen), ein detaillierter klinischer Untersuchungsbefund (einschließlich Muskelkraftgrade), eine Elektromyografie (EMG), die Entnahme einer Muskelbiopsie in der betroffenen Muskulatur (siehe 1.8.), die Bestimmung von Muskelenzymen (Kreatinkinase/CK, Laktatdehydrogenase/LDH), sowie von speziellen Autoantikörpern (siehe 1.3.1.). Zusätzlich haben die *European League Against Rheumatism* und das *American College of Rheumatology* (EULAR/ACR) im Jahr 2017 Klassifizierungskriterien erstellt, die mittels leicht bestimmbarer Merkmale helfen sollen, die Wahrscheinlichkeit einer vorliegenden IIM zu bestimmen. Ein webbasierter Rechner soll die Diagnose einer Myositis erleichtern und helfen einen Myositissubtyp zu bestimmen. (Bottai et al., 2017) Trotz eines Fortschritts von den historischen Klassifikationskriterien, fehlen in dieser Studie jedoch wichtige Aspekte, da z.B. die IMNM und die OM nicht als eigene Entität betrachtet und von der Vielzahl an AK nur Anti-Jo1 berücksichtigt werden (Bottai et al., 2017; Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022). Diagnostik wie eine Magnetresonanztomografie (MRT) und/oder eine Muskelsonografie können zur Bestimmung der betroffenen Muskulatur erwogen werden und die Auswahl eines geeigneten Muskels für eine Muskelbiopsie erleichtern (Dalakas, 2015; Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022). Die unterschiedlichen Formen von IIM können einen ähnlichen Phänotyp mit proximaler Schwäche und Hautsymptomen

präsentieren (Allenbach et al., 2017). Extramuskulären Manifestationen wie z.B. einer Arthritis, einer interstitiellen Lungenerkrankung (*Interstitial lung disease*; ILD) und/oder eine Beteiligung des Herzens deuten auf ein systemisches Inflammationsgeschehen hin und können das klinische Bild von manchen Patient*innen dominieren (Lundberg et al., 2021). Eine ausführliche klinische, serologische und morphologische Charakterisierung der verschiedenen jIIM-Subtypen, ähnlich den adulten Klassifizierungen, existiert bisher noch nicht und erschwert nicht nur die Diagnosefindung, sondern auch die Prognose und weitere Therapie (Soponkanaporn et al., 2019; Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013). Die Forschung legt nahe, dass eine Kategorisierung von verschiedenen Myositis-Syndromen in spezifische Subtypen nützlich ist, um die klinische Symptomatik, assoziierte Risikofaktoren, Reaktionen auf Therapien und die Prognose vorhersagen zu können (Rider, 2011).

Tab. 2: Überblick über die Klinik von adulten und juvenilen Myopathien

IIM	MSA/ MAA	Klinik
		aIIM und jIIM
DM	Mi2, NXP2, SAE, TIF1 γ , MDA5	<ul style="list-style-type: none"> - Akuter bis subakuter Verlauf - typische Hautbeteiligung: heliotroper Ausschlag, Lidödem, Gottron'sche Papeln, Gottron Zeichen, V-Zeichen, Shawl-Sign, Kalzinosen, Mechaniker-Hände, Nagelbettveränderungen - symmetrische proximale Muskelbeteiligung - normale CK bis 50-fach erhöht - selten Myokarditis - ILD v.a. MDA5 assoziiert - adult: assoziiert zu Malignomen v.a. bei TIF1γ und NXP2 - juvenil: keine Assoziation zu Malignität; erhöhtes Risiko für Kalzinosen v.a. bei Assoziation zu NXP2 und jüngeren Alter
ASyS	Jo-1, PL7, PL12, EJ, OJ, KS, Ha/YRS, Zo	<ul style="list-style-type: none"> - symmetrische proximale Muskelbeteiligung - „Mechaniker-Hände“ - CK bis 50-fach erhöht - ILD, Arthritis, Arthralgien, Raynaud Phänomen - juvenile Fälle sehr ähnlich den adulten Fällen
IMNM	HMGCR, SRP	<ul style="list-style-type: none"> - akute/subakute symmetrische proximale Muskelbeteiligung; - juvenil: langsamere Verläufe ähnlich Muskeldystrophie

		<ul style="list-style-type: none"> - fulminante Verläufe möglich - CK stark erhöht, bis zu 50-fach - ILD, Dysphagie, Herzmuskelbeteiligung, i.d.R. keine Hautbeteiligung, Beteiligung der Lunge selten - HMGCR: relativ selten Assoziation zu Malignomen, z.T. Statin-induziert - SRP: schwere Verläufe, starke Muskelbeteiligung, Myokarditis und Dysphagie; wenig juvenile Fälle
IBM	cN1A	<ul style="list-style-type: none"> - Alter >45 Jahre; betrifft vorrangig Männer - Asymmetrische proximale wie distale Paresen (v.a. Kniestrecker, Hüft-, Fingerbeuger und Schulterabduktoren) - CK normal, maximal bis auf das 15-fache erhöht - häufig Dysphagie (60 %, assoziiert mit cN1A), keine Hautbeteiligung, Myokarditis selten
OM	ANA Ro52, PM- Scl, Ku, U1- RNP, ...	<ul style="list-style-type: none"> - Kombination mit anderen Kollagenosen, vielfältige Klinik - CK bis 50-fach erhöht - ILD, Perikarditis, Arthritis, Glomerulonephritis, Raynaud Phänomen, Hautulcerationen, Sklerodaktylie, Dysphagie, Herzbeteiligung - höhere Mortalität (meist ILD bedingt) - vorrangig Kollagenosen wie SLE, SSc, lokale Sklerodermie; selten granulomatöse Merkmale, Sarkoidose - im Kindesalter: JIA

aDM=adulte Dermatomyositis, ANA=Antinukleäre Antikörper, ASyS=Antisynthetasesyndrom, CK=Kreatinkinase, EM=Elektronenmikroskopie, HMGCR=3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, IFN=Interferon, ILD=interstitielle Lungenerkrankung, IMNM=immunvermittelte nekrotisierende Myopathie, jDM=juvenile Dermatomyositis, JIA=juvenile idiopathische Arthritis, JIIM=juvenile idiopathisch inflammatorische Myopathie, MAA=Myositis-assoziierte-Antikörper, MHC=Major Histocompatibility Complex, MSA=Myositis-spezifische Antikörper, MxA=Myxovirusresistance Protein A, OM=Overlapmyositis, SLE=Systemischer Lupus erythematoses, SRP=Signal Recognition Particle, SSc=Systemische Sklerose (Aguila et al., 2014; Benveniste/Goebel/Stenzel, 2019; Bitencourt et al., 2020; Bonroy et al., 2022; Cavagna et al., 2019; Cerbelli et al., 2018; Dalakas, 2015; Damoiseaux et al., 2022; Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022; Fredi/Cavazzana/Franceschini, 2018; Gunawardena/Betteridge/McHugh, 2009; Kassardjian et al., 2015; Lucchini et al., 2021; Lundberg et al., 2021; Mescam-Mancini et al., 2015; Naveen

et al., 2021; Olazagasti et al., 2015; Preußé et al., 2016; Rider/Nistala, 2016; Sag et al., 2021; Siegert et al., 2021; Stenzel et al., 2021; Tanboon et al., 2020; Tansley et al., 2017; Tansley et al., 2014; Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013; Wu/Lu/Reed, 2020; Yasin et al., 2014)

1.3.1 Myositis-spezifische-Autoantikörper

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Myositis-spezifische-Autoantikörper (MSA) entdeckt, die die integrativen Diagnose von IIM stützen und Informationen über Subtyp und Prognose liefern (Abb. 1, Tab. 2, 3) (Damoiseaux et al., 2022). MSA sind AK, die bei mehr als 50 % der IIM vorkommen und als krankheitsspezifisch und sich gegenseitig ausschließend gelten. Im Gegensatz dazu, sind Myositis-assoziierte-Autoantikörper (MAA) weniger krankheitsspezifisch, da sie auch bei anderen systemischen autoimmunen rheumatischen Erkrankungen vorkommen und häufig mit einer OM verbunden sind. (Bonroy et al., 2022; Damoiseaux et al., 2022; Lundberg et al., 2021; Yeker et al., 2018) Etwa 20 – 30 % der Fälle weisen keine AK auf und werden als seronegative IIM bezeichnet (Lundberg et al., 2021).

Tab. 3: Extramuskuläre klinische Manifestationen und assoziierte MSA

Klinische Manifestation	MSA
Interstitielle Lungenerkrankung	PL-12, Jo1, EJ, PL-7, OJ, KS, Zo, Ha, MDA5
Raynaud Phänomen	TIF1 γ , Mi-2, NXP2, MDA5, SAE, PL-12, Jo1, EJ, PL-7, OJ, KS, Zo, Ha
Arthritis	PL-12, Jo1, EJ, PL-7, OJ, KS, Zo, Ha, MDA5, Mi2
Myocarditis	SRP
Dysphagie	SRP
Hautbeteiligung	
Ausschläge	TIF1 γ , Mi-2, NXP2, MDA5, SAE
Mechanikerhände	PL-12, Jo1, EJ, PL-7, OJ, KS, Zo, Ha, MDA5

Erklärung: Manche MSA sind mit spezifischer extramuskulärer Klinik assoziiert und können neben der Myositis zu Komplikationen führen. (Betteridge et al., 2019; Lundberg et al., 2021)

Die Entwicklung von einfachen Nachweismethoden für die MSA und MAA haben zu einem besseren Verständnis für Diagnose, Klassifizierung und Behandlung von IIM geführt (Bonroy et al., 2022; Damoiseaux et al., 2019). Bei Erwachsenen und Kindern handelt es sich um dieselben AK, jedoch kann die Verteilung und die Assoziation zu distinkten klinischen Manifestationen variieren (Tab. 2, 4) (Gunawardena et al., 2007; Lundberg et al., 2021; Stenzel et al., 2021; Yeker et al., 2018). Am deutlichsten zeigt sich der Unterschied in der Assoziation zu malignen Erkrankungen bei Erwachsenen, v.a. bei

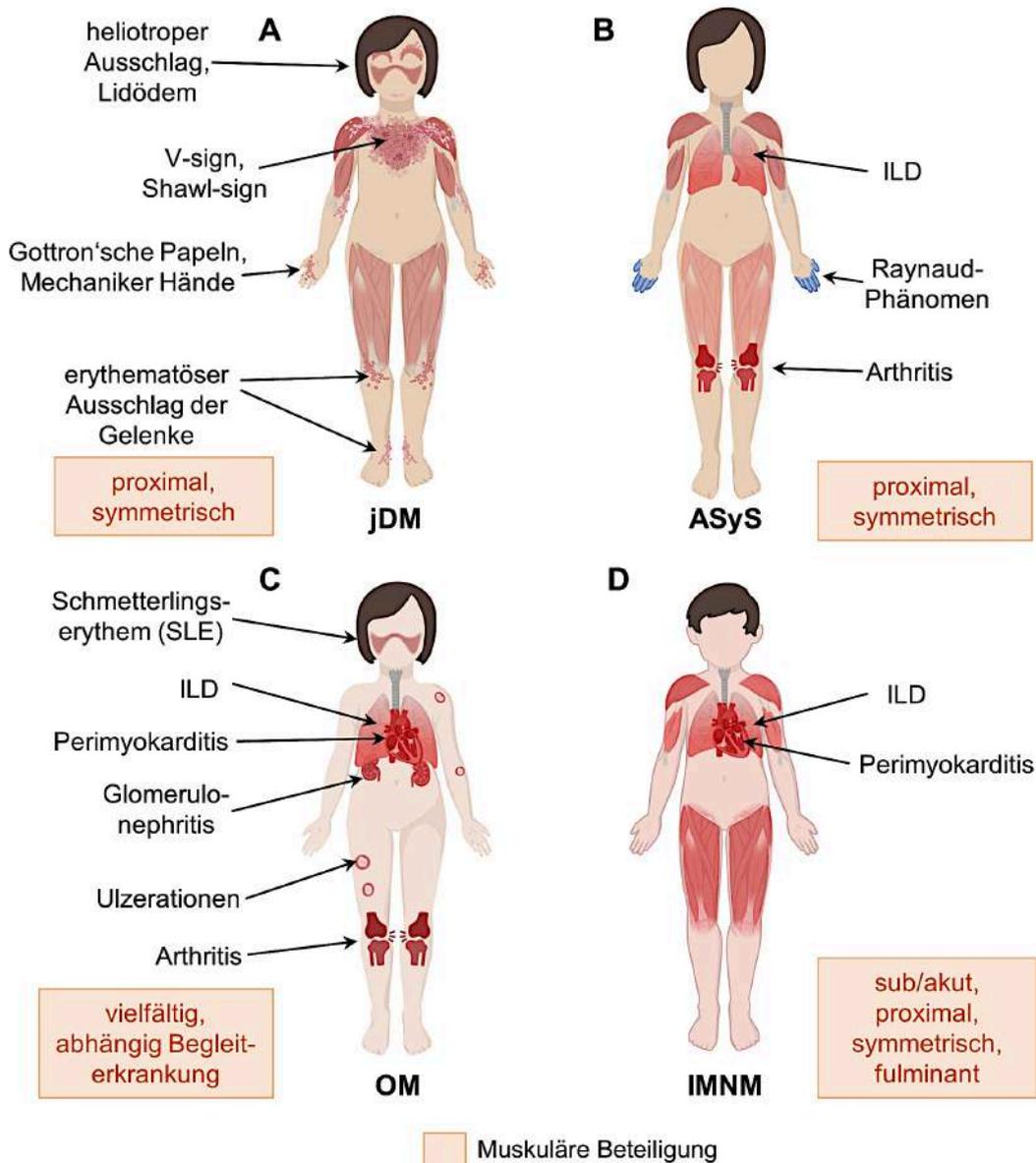


Abb. 2: Klinische Manifestationen von jIIM Subtypen (A-D) Eigene Abbildung orientiert an Rider/Nistala 2016 und Lundberg et al. 2021. Diese Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt. ASyS=Antisynthetasesyndrom, ILD=interstitielle Lungenerkrankung, jDM=juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch inflammatorische Myopathie, OM=Overlapmyositis, SLE=systemischer Lupus erythematoses

TIF1 γ -positiven DM Fällen, wohingegen bei jIIM keine Assoziation zu Krebs besteht (Dalakas, 2015; Gunawardena et al., 2007; McHugh/Tansley, 2018; Preuße et al., 2016; Stenzel et al., 2021; Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013). Weitere Studien haben die Assoziation von Serologie zu morphologischen Merkmalen untersucht und konnten subtypspezifische pathognomische Merkmale finden (Benveniste/Goebel/Stenzel, 2019; Tanboon et al., 2020; Yasin et al., 2019).

1.4 Die Dermatomyositis

Die DM ist eine polymorphe Form der IIM, die sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen auftreten kann. Neben einer voranschreitenden, subakut auftretenden, proximalen Muskelschwäche gehören distinkte Hauterscheinungen zu den Hauptmerkmalen dieser Erkrankung. (Dalakas, 2015) Die jDM ist mit etwa 81,2 bis 85 % der juvenilen Fälle die häufigste Form der IIM im Kindesalter (Tab. 1) (Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013; Wu/Lu/Reed, 2020). Trotz bestimmter genetischer und umweltbedingter Faktoren, die mit der adulten DM in Verbindung gebracht werden, gelten der Auslöser und die Mechanismen dieser Autoimmunkrankheit weiterhin als ungeklärt (Lundberg et al., 2021). Eine Vielzahl von Hautsymptomen werden als DM-typisch bezeichnet (Tab. 2, Abb. 2) (Dalakas, 2015; Sag et al., 2021; Wu/Lu/Reed, 2020). Diese früher als für die DM spezifisch geglaubten Hautmerkmale sind allerdings auch in anderen IIM Formen wie der OM und dem ASyS zu finden. Außerdem existieren auch Fälle von DM ohne Hautbeteiligung, weswegen eine weitere Diagnostik obligat durchzuführen ist. (Dalakas, 2015; Gunawardena/Betteridge/McHugh, 2009; Mariampillai et al., 2018; Tanboon et al., 2020) In adulten Fällen von DM ist ein erhöhtes Risiko von malignen Erkrankungen zu verzeichnen. Aufgrund dieser Tatsache sollte ein gründliches Screening bei diesen Patient*innen mit jährlichen Kontrollen erfolgen. Im Gegensatz dazu ist bis heute keine maligne Assoziation bei der jDM bekannt und ein Screening wird nicht routinemäßig durchgeführt. (Dalakas, 2015; Gunawardena/Betteridge/McHugh, 2009; Olazagasti et al., 2015; Preuße et al., 2016; Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013) Das Vorhandensein von DM-spezifischen MSA (anti-Mi2, anti-NXP2, anti-SAE, anti-TIF1 γ und anti-MDA5) gilt als definierend für die Diagnose einer DM (Bonroy et al., 2022). Dabei handelt es sich um die gleichen AK sowohl bei der juvenilen als auch bei der adulten DM, jedoch ist deren Verteilung stark variierend und die Assoziation zu bestimmten extramuskulären Symptomen ist verschieden (Tab. 4) (Benveniste/Goebel/Stenzel, 2019;

Gunawardena/Betteridge/McHugh, 2009; McHugh/Tansley, 2018; Rider/Nistala, 2016; Stenzel et al., 2021; Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013; Wu/Lu/Reed, 2020).

Tab. 4: MSA in adulter und juveniler DM

MSA	aDM Häufigkeit MSA; klinische Symptomatik	jDM Häufigkeit MSA; klinische Symptomatik
Anti-MDA5 (CADM-140)	13-30%; häufig pulmonale Beteiligung, fatale ILD-Verläufe, Arthritis, atypische Hautbefunde (Ulzerationen), milde Muskelbeteiligung (ggf. amyopathisch)	7-33%; sehr unterschiedlich verlaufend in verschiedenen ethnischen Gruppen, milde muskuläre Beteiligung, niedrige CK-Level, ILD gehäuft, Fieber, Arthritis, hohe IL-6, IL-18 und Ferritinwerte, Ulzerationen
Anti-TIF1γ (Anti-p155/140)	10-21%; schwerer Verlauf, häufig Malignom assoziiert ab dem 40. LJ (50 %), Dysphagie	22-32%; starke kutane Beteiligung, geringe CK-Level, häufig chronischer Verlauf
Anti-Mi2	4-20%; typische Hauterscheinungen, starke Beteiligung der Muskulatur	3-10%; hohe CK-Level, geringe Mortalität, gute Prognose, kaum kutane Beteiligung, milder Verlauf
Anti-NXP2 (Anti-MJ)	3-24%, häufig Malignom assoziiert, gehäuftes Auftreten von Kalzinosen, Dysphagie	18-23%; Muskelkrämpfe, Gelenkkontrakturen, moderate CK-Level, starke Assoziation zu Kalzinosen und gastrointestinalen Ulzerationen, Dysphonie, schlechte Prognose, schwere Verläufe
Anti-SAE	<10%, häufig erst Hauterscheinungen (amyopathisch) und später Myositis, ILD assoziiert	<1%, ggf. nicht existent in jDM

Die Häufigkeiten spiegeln den Streubereich verschiedener Publikationen wider. aDM=adulte Dermatomyositis, CK=Kreatinkinase, IL=Interleukin, ILD=interstitielle Lungenerkrankung, jDM=juvenile Dermatomyositis, LJ= Lebensjahr, MSA=Myositis-spezifische-Antikörper (Lundberg et al., 2021; Rider/Nistala, 2016; Rider, 2011; Stenzel et al., 2021; Tanboon et al., 2020; Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013; Wedderburn/Rider, 2009; Wu/Lu/Reed, 2020)

1.5 Das Antisynthetasesyndrom

Die Diagnose des ASyS basiert auf der klinischen Kombination von einer Myositis ähnlich der DM mit proximaler Schwäche (in ca. 90 % der Fälle), ILD, Arthritis bzw. Arthralgien (Gelenkschmerzen), „Mechaniker-Händen“, Raynaud Phänomen und Fieber; und der Präsenz von spezifischen Antikörpern gegen die Aminoacyl-transfer-RNA-Synthetase (Antisynthetase) (Tab. 2, 3; Abb. 2) (Cerbelli et al., 2018; McHugh/Tansley, 2018; Tanboon et al., 2020). Bis heute sind acht verschiedene Autoantikörper bei Patient*innen mit ASyS identifiziert worden: am häufigsten Anti-Jo-1 (15-30 %), Anti-PL-7 (5-10 %) und Anti-PL-12 (<5 %) (Cavagna et al., 2019; Lundberg et al., 2021). Etwa 5-12 % der jIIM sind mit einem ASyS assoziiert und zeigen ein ähnliches klinisches Bild wie die adulten Fälle (Rider/Nistala, 2016; Wu/Lu/Reed, 2020). In Anti-Jo-1-Fällen wurde eine Tendenz zu einer rein muskulären klinischen Symptomatik beobachtet, wohingegen Patient*innen mit Anti-PL-7 oder Anti-PL-12 mehr mit einer ILD assoziiert sind (Cavagna et al., 2019; Cerbelli et al., 2018; Tanboon et al., 2020).

1.6 Die Overlapmyositis

Circa 6 – 11 % der juvenilen Fälle weisen Kriterien sowohl einer entzündlichen Myositis als auch einer anderen Autoimmunerkrankung auf (Rider/Nistala, 2016). Häufig zu beobachten ist eine IIM in Kombination mit einem systemischen Lupus erythematoses (SLE), einer systemischen Sklerose (SSc), rheumatoider Arthritis oder einem Sjögren Syndrom. Typischerweise einhergehend mit Myositis-assoziierten-Antikörpern (MAA), die in letzter Zeit das Spektrum der OM sichtlich erweitert haben. (Aguila et al., 2014; Fredi/Cavazzana/Franceschini, 2018; Lundberg et al., 2021) Das klinische Bild zeigt sich sehr vielfältig mit für die Kollagenosen typischen extramuskulären Symptomen, wie z.B. Raynaud Phänomen, Arthritis, Sklerodaktylie (Verhärtung der Fingerhaut), Dysphagie und ILD (Tab. 2, Abb. 2) (Aguila et al., 2014; Fredi/Cavazzana/Franceschini, 2018; Naveen et al., 2021; Rider/Nistala, 2016). Zu den häufigsten MAA zählen Anti-Ro52, Anti-PM-Scl, Anti-Ku und Anti-U1-RNP (Bonroy et al., 2022; Lundberg et al., 2021). Weiterhin sind häufig Antinukleären Antikörpern (ANA) nachweisbar (Aguila et al., 2014; Siegert et al., 2021).

1.7 Die immunvermittelte nekrotisierende Myopathie

Die IMNM kann eine breite Altersspanne von Menschen betreffen, überwiegend handelt es sich um adulte Fälle und sehr selten um juvenile (Della Marina et al., 2021; Tanboon et al., 2020). Die IMNM präsentiert sich mit akut oder subakut einsetzender

symmetrischer Muskelschwäche, die fulminante Verläufe annehmen kann. Meist beginnen die Paresen proximal. (Dalakas, 2015; Kassardjian et al., 2015; Kishi et al., 2017) Eine Beteiligung der Herzmuskulatur und Dysphagie können auftreten (Kishi et al., 2017; Lundberg et al., 2021; Tansley et al., 2017). In einer kleineren Fallstudie zeigte ein Kind im Vergleich zu adulten IMNM einen langsameren Krankheitsverlauf, ähnlich einer Muskeldystrophie (Mohassel et al., 2017). Als Auslöser der autoimmunen Erkrankung gelten z.B. ein Virusinfekt oder die Einnahme von Statinen. Typischerweise verschlechtert sich die Myopathie trotz Absetzen der Medikamente. (Dalakas, 2015) Die IMNM wird anhand der AK in drei Subgruppen kategorisiert: Anti-SRP (AK gegen das Signal Recognition Particle), Anti-HMGCR (AK gegen 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, pharmakologischer Angriffspunkt für Statine) und eine seronegative Form (Lundberg et al., 2021; Tanboon et al., 2020). Anti-SRP ist mit einem schwereren Verlauf und starker Muskelbeteiligung, v.a. auch der Herzmuskulatur und einer Dysphagie, assoziiert (Lundberg et al., 2021). Die Anti-HMGCR-Gruppe ist häufig jünger und mit einem schwereren Verlauf assoziiert (Kishi et al., 2017). Seronegative Patient*innen zeigen eine gehäufte Assoziation zu malignen Erkrankungen und extramuskulären Symptomen (Tanboon et al., 2020). Anti-SRP in jIIM ist sehr selten, bei <3 % der jIIM handelt es sich um Anti-HMGCR IMNM (Wu/Lu/Reed, 2020).

1.8 Die Muskelpathologie als wichtiger Baustein bei der integrativen Diagnose einer Myositis

Die Aufarbeitung einer Muskelbiopsie ist hilfreich, pathologische Merkmale zu identifizieren und spielt eine wichtige Rolle bei der Diagnostik von neuromuskulären Erkrankungen (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S.2; Gehlen/Delank, 2010, S., S.96). Die Muskelbiopsie ist nach wie vor von entscheidender Bedeutung, um neue Erkenntnisse über mögliche Pathomechanismen der Erkrankung zu gewinnen, sowie die Diagnostik und Therapiestrategien zu verbessern (Tanboon et al., 2020). Nachfolgend soll zum besseren Verständnis dieser Arbeit ein Überblick über eine normale Muskelbiopsie und mögliche pathologische Veränderungen v.a. bei inflammatorischen Myositiden (siehe Tab. 5, Abb. 3) gegeben werden.

Tab. 5: Pathologische Veränderungen in der Muskelbiopsie von inflammatorischen Myopathien

IIM	Morphologie
allgemein	<ul style="list-style-type: none"> - Nekrose - gesteigerte Phagozytose - Fibrosierung (in variable Graduierung) - „Mottenfraß“-Fasern (Disruption des myofibrillären Netzwerks) - „Geister-Fasern“ (Verlust der Anfärbefähigkeit von Fasern) - Vorhandensein von inflammatorischen Zellen - sarkolemmale Hochregulation von MHC I
DM	<ul style="list-style-type: none"> - perifaszikuläre Atrophie, ggf. Nekrose; begleitet von Invasion inflammatorischer Zellen - Pathologie von endomysialen Gefäßen (Reduktion, Komplementablagerungen, Untergang von Endothelzellen, ultrastrukturelle Einschlüsse) - Hochregulation IFN I induzierender Marker z.B. MxA, ISG15 auf Muskelfasersarkolemm - EM: tubuloretikuläre Einschlüsse in den kapillären Endothelzellen
ASyS	<ul style="list-style-type: none"> - perifaszikuläre ödematöse Nekrose mit endomysialer Infiltration von Entzündungszellen, v.a. T-Zellen - perimysiale Ablagerung von Alkalischer Phosphatase - diffuse Expression von MHC I, MHC II und Komplementablagerungen sarkolemmal betont
OM	<ul style="list-style-type: none"> - perifaszikuläre Atrophie (diffus verteilt) - unspezifische diffuse perimysiale Inflammation - Muskelfasernekrosen <p>SSc: charakteristischer histologischer Typ mit minimaler Inflammation und verstärkter kapillärer Pathologie (MMCP)</p>
IMNM	<ul style="list-style-type: none"> - Nebeneinander von Muskelfasernekrosen und -regeneraten, - geringe oder fehlende Lymphozytäre Infiltrate - milde, häufig lokal begrenzte MHC I Hochregulation mit veränderten Kapillaren - typisches Expressionsmuster von autophagischen Markern

Erklärung: ASyS= Antisynthetasesyndrom, DM= Dermatomyositis, EM=Elektronenmikroskopie, IFN=Interferon, IIM=Idiopathisch inflammatorische Myopathien, IMNM= immunvermittelte nekrotisierende Myopathie, ISG=Interferon-stimulated-gene, MHC=Major Histocompatibility Complex, MxA=Myxovirus Resistance

Protein A, OM=Overlapmyositis, SSc=Systemische Sklerose (Bitencourt et al., 2020; Carpenter et al., 1976; Cerbelli et al., 2018; Dalakas, 2015; Damoiseaux et al., 2022; Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S.187; Greenberg et al., 2005; Kassardjian et al., 2015; Siegert et al., 2021)

Im Querschnitt der Normalmuskulatur sind die polygonalen Muskelfasern dicht aneinander gepackt (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S.24). In pathologischen Situationen können sich Form und Größe der Muskelfasern verändern. Gründe, dass Muskelfasern schrumpfen können (Atrophie), sind z.B. das Fehlen von trophischen Reizen (Nervenschäden) oder durch Immobilisation und dem Ausbleiben von körperlicher Aktivität. (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S.46-47) Die Zellkerne der Muskelfasern sind von elliptischer Form, randständig und besitzen einen deutlichen Nukleolus mit fein gestreiftem Nukleoplasma (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S.24; Welsch/Kummer, 2014, S.143). Durch ein regelmäßig angelegtes Gefäßnetzwerk wird der Muskel versorgt. Kleine endomysiale Gefäße befinden sich zwischen extrazellulärer Matrix und mittelgroße Arteriolen und Venen verlaufen in Faszikeln des Perimysiums. (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S.24) Zur natürlichen Homöostase der Zellen gehören auch der kontrollierte Zelluntergang (Apoptose) und Regenerationsprozesse in vereinzelt Fasern. Davon abzugrenzen ist der nekrotische Untergang von Muskelfasern durch z.B. Sauerstoff-, Nährstoffmangel aufgrund von Durchblutungsstörungen, der für einen myopathischen Prozess im Muskel spricht. (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S.57) Mithilfe von Färbungen können pathologische Veränderungen dargestellt werden. So können Standardfärbungen wie z.B. die Hämalaun/Hämatoxylin & Eosin (HE) Färbung einen Überblick der Muskelmorphologie schaffen. Sie wird genutzt zur Betrachtung der Muskelfaserstruktur, von den Zellkernen, Fett- und Bindegewebe, sowie dem Vorhandensein von Entzündungszellen und Gefäßen (Abb. 3, 6). (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S.14) Weiterhin werden histochemische Färbungen genutzt, um biochemische Veränderungen zu erkennen. So kann neben der Analyse der unterschiedlichen Beschaffenheit der Muskelfasern auch das Fehlen von bestimmten Enzymen oder der Überschuss bestimmter Substrate erkannt werden. (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S.14-17) Durch immunhistochemische Verfahren kann

die Expression von Proteinen beurteilt werden, die auch zur weiteren molekularen Evaluation der Muskulatur beitragen können (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S. 140).

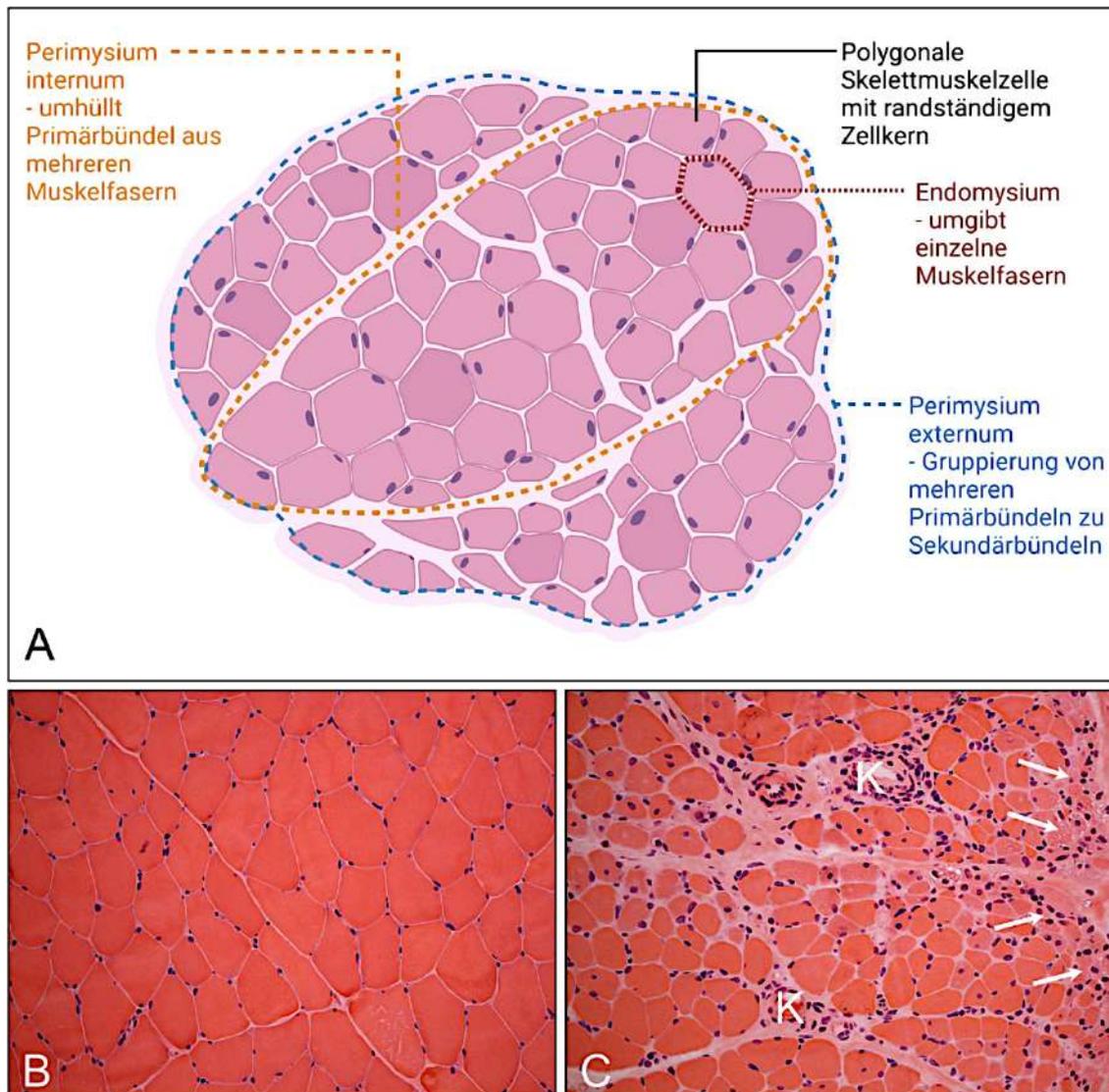


Abb. 3: Die Skelettmuskelbiopsie – der Normalbefund versus Pathologie A: Die Skelettmuskulatur im schematischen Querschnitt. Die einzelnen Muskelfasern werden von einem Hüllsystem von Bindegewebe zusammengefasst. Die Skelettmuskelfaser ist ein polygonales Synzytium mit randständigen Zellkernen. Eigene Abbildung orientiert an (Nolte, 2022). Diese Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt. Bild B zeigt einen Normalbefund mit polygonalen Muskelzellen mit randständigen Zellkernen. In Bild C sind atrophe Zellen im perifaszikulären Bereich (Pfeile) einer Patientin mit jDM zu erkennen. Zudem findet sich eine begleitende Invasion von Entzündungszellen perikapillär (K) und perifaszikulär (Pfeile). B+C: Eigene Fotografien: Vergrößerung 200x. jDM=juvenile Dermatomyositis, K=Kontrolle, P=Patient*in

1.9 Prognose und Therapiemöglichkeiten von IIM

Die Prognose und Therapie der verschiedenen IIM ist vom Subtyp abhängig (Dalakas, 2015). Ein kausaler Therapieansatz besteht für die IIM noch nicht und heutige Schemata beruhen auf retrospektiv betrachteten Kollektiven oder kleinen Therapiestudien (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022; Glaubitz/Zeng/Schmidt, 2020; Lundberg et al., 2021; Smith/Paik, 2020). Ziel der Therapie sollte die Wiederherstellung der Muskelkraft zur Verbesserung der Alltagfunktionen sein und ein Aufhalten von eventuell bestehenden Komplikationen wie z.B. Kalzinosen und Dysphagie (Dalakas/Irlbacher, 2016, S.2704). Das Management der IIM stellt durch die geringe Inzidenz und hohe klinische Variabilität eine Herausforderung dar (Lundberg et al., 2021). Derzeit haben vor allem die physikalische Therapie und orthopädische Hilfsmittel ihre Wirksamkeit zur Muskelstabilisierung und einer Beibehaltung von Funktionalität bewiesen (Catalán/Selva-O'Callaghan/Grau, 2014; Dalakas/Irlbacher, 2016, S.2705). Körperliche Bewegung sollte deshalb als Standardbehandlung für die adulte und juvenile Myositis in Betracht gezogen werden (Lundberg et al., 2021). Die medikamentöse Initialtherapie besteht primär aus Glukokortikoiden (Glaubitz/Zeng/Schmidt, 2020; Patwardhan/Spencer, 2021; Smith/Paik, 2020). Jedoch müssen etwa 75 % der Patient*innen mit einem zusätzlichen Immunsuppressivum behandelt werden (Dalakas/Irlbacher, 2016, S.2704). Bei weiterer Therapieintensivierung können IVIg (Intravenöse Immunglobuline) verabreicht werden, deren Nutzen leider nur kurzfristig anhält (<8 Wochen) und die einen hohen Kostenfaktor besitzen (Dalakas/Irlbacher, 2016, S.2704-2705; Lundberg et al., 2021; Patwardhan/Spencer, 2021). Die gegenwärtig verwendeten Klassifizierungen der Myositis, die auf den neuesten pathophysiologischen und immunologischen Erkenntnissen beruhen, legen nahe, dass eine zielgerichtete subtypspezifische Therapie die beste Behandlungsoption darstellt (Glaubitz/Zeng/Schmidt, 2020; Patwardhan/Spencer, 2021; Stenzel et al., 2021). Durch die Entwicklung von Biologika (biotechnologisch hergestellte monoklonale Antikörper, die gezielt an Proteine binden können und diese ausschalten) wurden neue Behandlungsoptionen für therapieresistente Fälle bzw. weitere Möglichkeiten für Patient*innen geschaffen, die unter starken Nebenwirkungen leiden und eine bestehende Therapie ggf. abbrechen mussten. Zu dieser Gruppe zählen u.a. CD20- und TNF α -Inhibitoren. (Patwardhan/Spencer, 2021; Smith/Paik, 2020) Genexpressionsprofile von Patient*innen mit Autoimmunerkrankungen können hilfreich sein, um die zugrunde liegenden molekularen Signalwege dieser Krankheiten aufzudecken (Baechler et al.,

2006). So hat sich gezeigt, dass der Typ-1-Interferon (IFN1)-Signalweg eine wichtige Rolle in der Pathogenese der DM spielt (Baechler/Bilgic/Reed, 2011). Als morphologisches Korrelat dieser Hypothese zeigten Muskelbiopsien von DM-Patient*innen eine perifaszikuläre Expression von IFN1-induzierenden Proteinen wie z.B. Myxovirus-Resistance Protein A (MxA) (Soponkanaporn et al., 2019; Uruha et al., 2019). Januskinase (JAK)-Inhibitoren hemmen die Aktivierung von IFN1-regulierenden Proteinen und könnten sich als hilfreich in der Therapie von DM erweisen. So zeigten zielgerichtete Therapien mit JAK-Inhibitoren Erfolge bei therapierefraktären Fällen von DM und auch eine deutliche Besserung von Kalzinosen. (Ladislau et al., 2018; Paik et al., 2021; Patwardhan/Spencer, 2021)

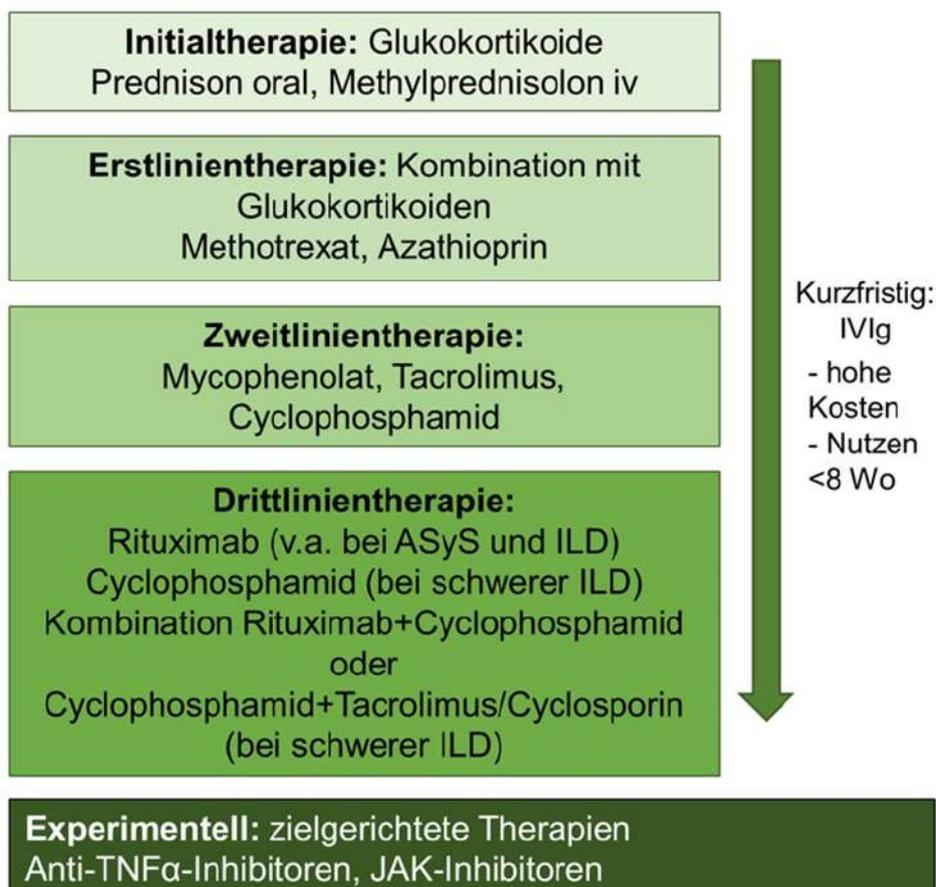


Abb. 4: Die medikamentöse Therapie der IIM Die IIM werden in der Regel immunsuppressiv behandelt. Es gibt Möglichkeiten, bei Verschlechterung der Symptomatik und bei Komplikationen die Therapie zu intensivieren. Begleitend ist eine physikalische Therapie empfohlen. Schema modifiziert nach Lundberg et al. 2021. ASyS=Antisyndrom, IIM=idiopathisch inflammatorische Myopathie, ILD=interstitielle Lungenerkrankung, IVIg=intravenöse Immunglobuline, iv=intravenöse, Wo=Wochen

1.10 Fragestellung

Die integrative Klassifikation von IIM hat sich in den letzten Jahren stark weiterentwickelt und Studien zeigen, dass eine subtypspezifische Therapie, wie z.B. mit JAK-Inhibitoren bei Patient*innen mit DM (Soponkanaporn et al., 2019), die Prognose und Outcome verbessern kann (Allenbach et al., 2017; Benveniste/Goebel/Stenzel, 2019; Dalakas, 2015; De Bleecker et al., 2015; Patwardhan/Spencer, 2021). Jedoch besteht noch immer keine einheitliche Klassifizierung für die IIM und das Fehlen eines breiten internationalen Konsenses über Diagnosekriterien hat zu klinischen Unsicherheiten geführt (Zoske et al., 2021). Bestehende Klassifikationen wurden zudem meist an Patient*innen im Erwachsenenalter etabliert, aber auch Kinder und Jugendliche können an einer IIM erkranken und weisen Unterschiede zu den adulten Fällen auf. Die vorliegende Arbeit soll helfen, die Diagnose juveniler Patienten mit IIM besser klassifizieren zu können. Dazu wurden neben klinischen Parametern, Laborbefunden und serologischen Markern wie MSA, die Muskelbiopsien untersucht und mit den Kriterien für die Klassifikation bei adulten Patienten mit IIM verglichen. Darüber hinaus sollen durch die ausführlichen morphologischen Analysen weitere Erkenntnisse zur Pathogenese der Erkrankung gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software sind im Anhang aufgelistet.

2.2 Untersuchungskohorte und Probengewinnung

2.2.1 Juvenile Patient*innen mit klinischer Diagnose einer Myositis

Fünfzehn Kinder und Jugendliche mit der klinischen Diagnose einer IIM (medianes Alter 8 Jahre, Spannweite 3 – 17 Jahre, 73 % weiblich), wurden aus der Abteilung für Neuropädiatrie des Universitätsklinikums in Gießen im Zeitraum von 2002 bis 2018 in die Studie eingeschlossen (Abb. 5). Allen Patient*innen wurde zum diagnostischen Zweck eine Muskelbiopsie entnommen und im Institut für Neuropathologie in Gießen bearbeitet. Die klinischen und laborchemischen Daten der Patient*innen wurden retrospektiv aus der Datenbank erhoben (Tab. 10, 11, 12).

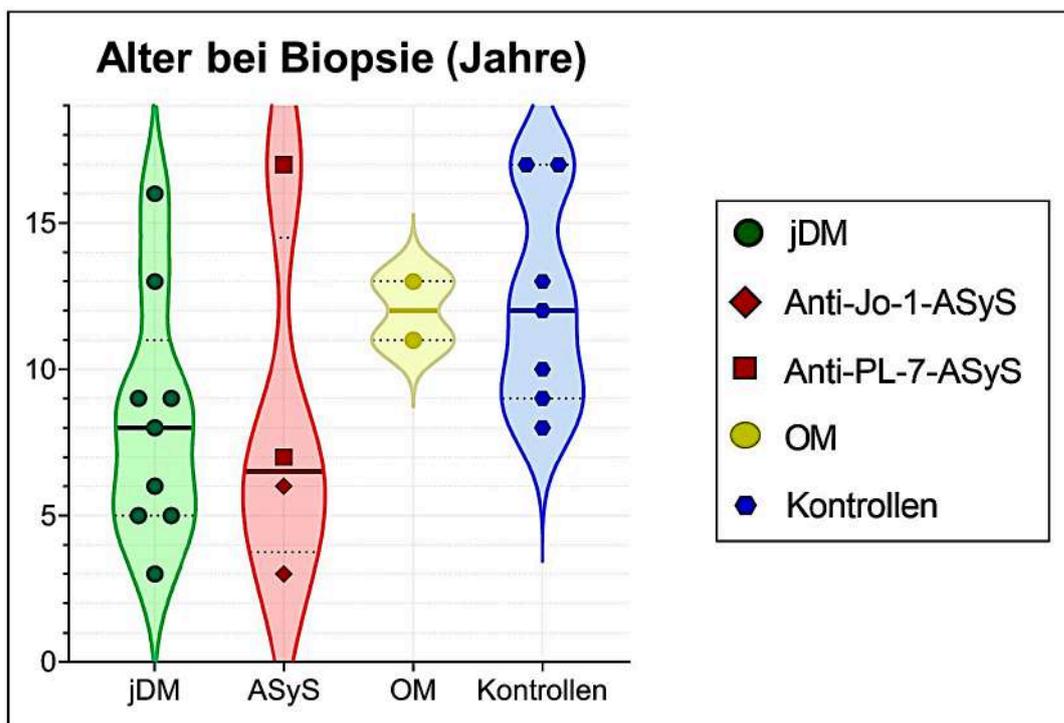


Abb. 5: Altersverteilung der jIIM Subtypen in Jahren im Vergleich zu den Kontrollen
Violin Plots zur Altersverteilung der vorliegenden Studie. Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Individuum. Von den einzelnen IIM-Gruppen und den Kontrollen wurde zusätzlich die mediane Altersverteilung bestimmt (dicker Querstrich). Eigene Abbildung erstellt mithilfe GraphPad Prism. ASyS=Antisynthetasesyndrom, jDM= Juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, OM=Overlapmyositis

2.2.2 Proband*innen ohne pathologische Muskelbiopsie (Kontrollgruppe)

Es wurden die Muskelbiopsien von sieben Kindern und Jugendlichen unterschiedlichen Alters (mittleres Alter $12,3 \pm 3,6$ Jahre, Median 12 Jahre, Spannweite 8 – 17 Jahre, 33 % weiblich) als Kontrollen in die Studie eingeschlossen (Abb. 5). Die Biopsien wurden zu diagnostischen Zwecken zum Ausschluss einer neuromuskulären Erkrankung entnommen. Bei der Beurteilung der Muskelbiopsien zeigten sich keine histologischen und/oder ultrastrukturellen Pathologien, respektiv waren diese mit einem morphologischen Normalbefund oder geringen pathologischen Veränderungen zu vereinbaren (Tab. 6).

Tab. 6: Verdachtsdiagnosen und Biopsiecharakteristika der Kontrollgruppe

Kennung	Geschlecht	Alter bei Biopsie (Jahre)	Verdachtsdiagnose	Befund (Lichtmikroskopie und TEM)
K1	w	8	Neuromuskuläre Erkrankung	Geringe Kalibervariation ohne spezifische Pathologie
K2	w	9	Muskelerkrankung	Muskel ohne spezifische Pathologie
K3	m	10	Muskelerkrankung	Geringe Kalibervariation ohne spezifische Pathologie
K4	m	12	Schmerzen unklarer Ätiologie im Oberschenkel, Muskelerkrankung	Muskel ohne spezifische Pathologie
K5	m	13	Dermatomyositis	Geringe Kalibervariation ohne spezifische Pathologie
K6	m	17	Myopathie	Muskel ohne spezifische Pathologie
K7	m	17	Muskelerkrankung	Muskel ohne spezifische Pathologie, elektronenmikroskopisch geringe unspezifische Veränderungen

Erklärung: Kontrollgruppe mit klinischen Verdachtsdiagnosen und myopathologischem Befund. K=Kontrolle, m=männlich, TEM=Transmissionselektronenmikroskopie, w=weiblich

2.2.3 Ethikvotum

Für diese Studie liegt ein positives Ethikvotum der Justus-Liebig-Universität in Gießen vor (07/09; 258/16). Die Zustimmungen der Proband*innen beziehungsweise deren Eltern liegen vor.

2.2.4 Durchführung der Muskelbiopsie

Zur Diagnosesicherung einer juvenilen IIM kann eine Muskelbiopsie hilfreich sein. Der Entnahmeort richtet sich zum einen nach der klinischen Symptomatik, im Falle der jIIM meist die proximalen Skelettmuskeln wie z.B. der *M. quadriceps femoris* oder der *M. deltoideus*, zum anderen nach bereits durchgeführten Zusatzuntersuchungen (z.B. Sonografie, Kernspintomografie). Für eine bessere diagnostische Qualität sollte die Muskulatur nicht stark atrophiert oder verfettet sein. An der Stelle zur Muskelentnahme sollte keine Elektromyographie oder eine intramuskuläre Injektion erfolgt sein. Ein etwa 1x1x1 cm³ großes Muskelstück wird unter größtmöglicher Vorsicht entnommen. Artefakte durch Quetschung oder Zerrung sollten vermieden werden.

2.2.5 Weiterverarbeitung der Proben zu Kryostatschnitten

Die entnommenen Proben wurden unfixiert in das Institut für Neuropathologie in Gießen zur weiteren Verarbeitung gebracht. Zur Anfertigung von Kryostatschnitten wurden die Proben mit Hilfe von *Tissue-Tek-Compound* Auffriermedium auf ein Korkplättchen ausgerichtet, so dass ein Querschnitt zum Faserverlauf entsteht. Anschließend wurden die Proben in Methylbutan bei – 80 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Schneiden bei – 80 °C aufbewahrt. Zur Anfertigung von 6 µm dicken Kryoschnitten am Leica CM 1950 Kryostat (Leica Biosystems, Wetzlar), wurden *SuperFrost* Objektträger verwendet. Die Schnitte konnten dann zur sofortigen Weiterverarbeitung verwendet oder für spätere Färbungen bei – 20 °C im Gefrierschrank asserviert werden.

2.2.6 Fixierung und Weiterverarbeitung der Proben zur ultrastrukturellen Analyse (Transmissions-Elektronenmikroskopie=TEM)

Für die elektronenmikroskopische Analyse wurden die nativen Proben mit einer 6 % - igen Glutaraldehydfixierlösung für 24 – 48 h bei 4 °C fixiert. Danach wurde das Gewebe mit einem Phosphatpuffer mehrmals für eine Stunde auf dem Probenschüttler gewaschen. Anschließend wurden die Proben zugeschnitten und mit Hilfe des Leica EM-TP Entwässerungsautomaten (1 % - Osmiumlösung und aufsteigende Ethanolreihe, Protokoll im Anhang) für die Einbettung in Epoxidharz vorbereitet (Einbettungsprotokoll

im Anhang). Die eingebetteten Proben wurden dann für 24 h in einem Exsikkator aufbewahrt und das überschüssige Wasser an *Phosphorus pentoxid* gebunden. Am nächsten Tag wurden die Proben für Längs- und Queranschnitte in Agar gefüllte Silikonförmchen gelegt und für die Zuordnung gekennzeichnet. Anschließend mussten die epoxid-eingebetteten Blöcke (Epon-Blöcke) für zwei bis drei Tage im Brutschrank bei 60 °C aushärten. Dann wurden die Blöcke mit dem Ultratrim zurechtgeschnitten und mithilfe des Ultramikrotom wurden 0,99 µm dicke Semidünnschnitte und 0,15-0,23 µm dicke Ultradünnschnitte angefertigt. Die Semidünnschnitte wurden nach Richardson gefärbt und die Ultradünnschnitte wurden am Leica EM AC20 kontrastiert (siehe Protokolle im Anhang).

2.3 Histologische Färbungen

2.3.1 Standard- und Enzymfärbungen am Muskel

Für die Diagnose einer Muskelerkrankung sind zahlreiche Färbungen am Muskelgewebe empfohlen (De Blecker et al., 2015; Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022; Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2013, S.16-27). Im Folgenden sind die für diese Studie wesentlichen Färbungen genauer aufgeführt. Die Färbungen sind im Rahmen der Routinediagnostik im Neuromuskulären Labor des Instituts für Neuropathologie in Gießen durchgeführt worden. Die Färbeprotokolle sind im Anhang aufgelistet.

- a) **Hämalaun-Eosin (HE):** Eine wichtige histologische Übersichtsfärbung, die zur Unterscheidung der Zellkerne zum Zytoplasma dient. Das positiv-geladene Hämalaun färbt den Kern an (basisch) und das negativ-geladene Eosin dient zur Anfärbung des Zytoplasma (sauer) (Abb. 6). (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2013, S. 16-18; Riedelsheimer/Büchl-Zimmermann, 2015, S. 201-202)

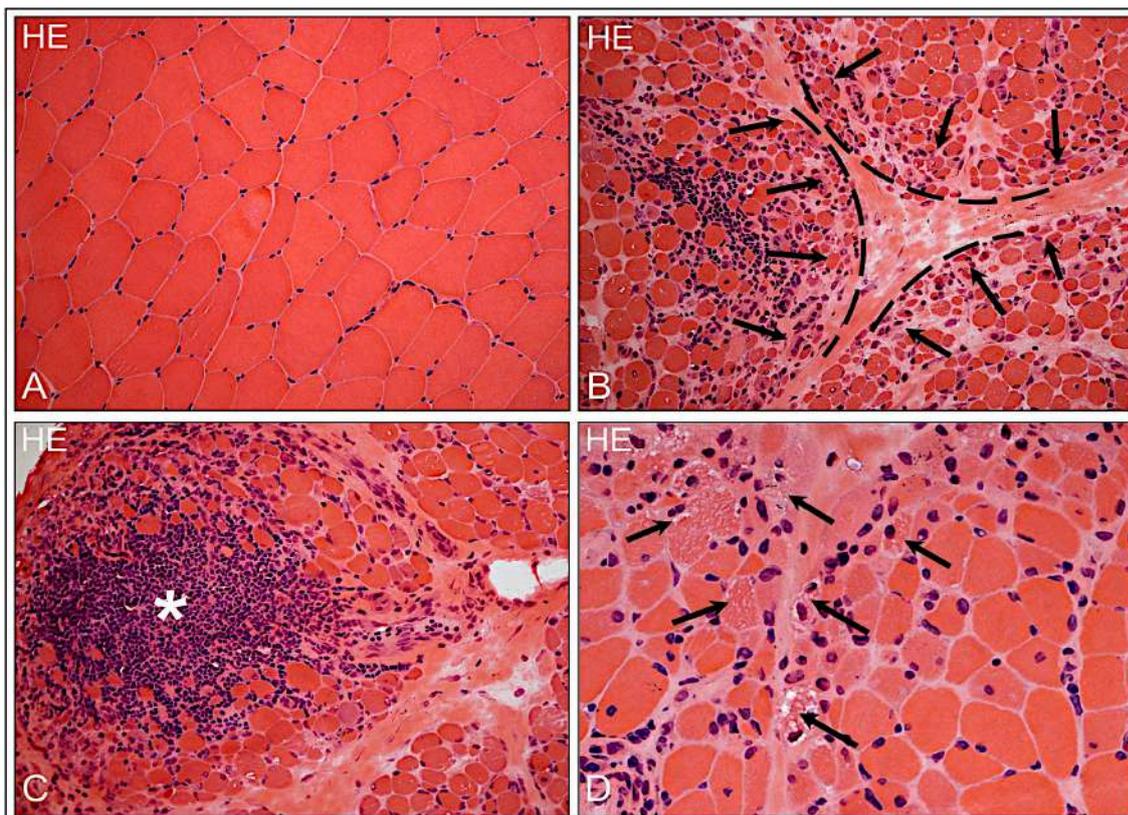


Abb. 6: Hämalaun-Eosin gefärbte Kryostatschnitte der gesunden Skelettmuskulatur im Vergleich zu jIIM Kontrolle A: polygonale Muskelzellen mit randständigen Kernen (K4, 200x Vergrößerung). jIIM: B: Atrophe Muskelzellen (Pfeil) mit Betonung im perifaszikulären Bereich (---) der Muskelfasern (P14, 200x) C: Darstellung von Entzündungszellen (*) (P14, 200x) D: Punched-out-vacuoles (Pfeile) als Zeichen von Myolinolyse (P12, 400-fach). Eigene Fotografien. jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, K=Kontrolle, P=Patient*in

b) Cytochrom-C-Oxidase/Succinatdehydrogenase (COX-SDH): Doppelfärbung zum Aktivitätsnachweis von Enzymen der mitochondrialen Atmungskette (Komplex II und IV). Die Färbung gilt als Nachweis der oxidativen Tätigkeit dieser Enzyme, welche typischerweise in mitochondrienreichem Gewebe zu finden ist. Im Normalzustand erscheinen die Muskelfasern braun, bei COX-Defizienz bläulich/violett (Abb. 7). (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2013, S. 17-18; Welsch, 2015, S. 410-412)

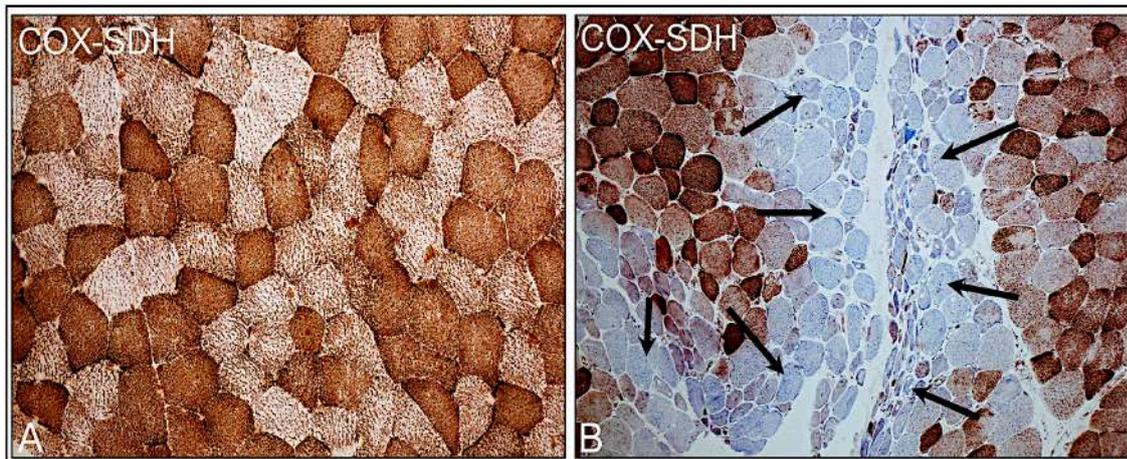


Abb. 7: COX-SDH-gefärbte Kryostatschnitte der gesunden Skelettmuskulatur im Vergleich zu jIIM A: Kontrolle mit regelhafter brauner COX Expression (K4) B: Dermatomyositis mit Defizienz der COX Expression mit Darstellung von bläulich/violetten COX-negativen-Fasern (Pfeile) (P2). Eigene Fotografien: Vergrößerung 200x. COX= Cytochrom-C-Oxidase, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, K=Kontrolle, P=Patient*in

c) Alkalische Phosphatase (ALP): Die Färbung der ALP ist ein hilfreicher Indikator für einen muskulären oder vaskulären Schaden. In normalen Muskelgeweben zeigt sich, bis auf in kleinen Arteriolen, keine Aktivität der ALP. In einem aktiv entzündlichen Zustand des Muskels tritt das Enzym durch erhöhte Permeabilität der Kapillaren in das Interstitium aus. So zeigt sich eine feine schwarze perimysiale oder perifaszikuläre Anfärbung der ALP insbesondere bei dem Anti-Jo1-ASyS (Abb. 8). (Bucelli/Pestronk, 2018; Buckley/Bossen, 2013; Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2013, S. 18-20; Mescam-Mancini et al., 2015; Mozaffar/Pestronk, 2000)

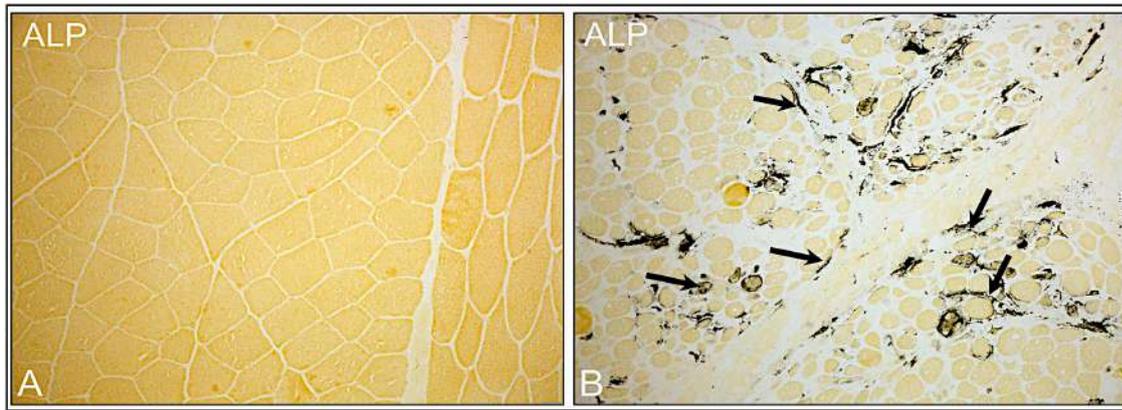


Abb. 8: Alkalische Phosphatase (ALP) gefärbte Kryostatschnitte der gesunden Skelettmuskulatur im Vergleich zu jIIM Kontrolle (A) keine Expression von ALP (K4) B (jIIM): Während eines inflammatorischen Prozesses kann es zu schwärzlichen perimysialen Ablagerungen (Pfeile) kommen, insbesondere beim Anti-Jo1-ASyS (P14). Eigene Fotografien: Vergrößerung 200x. jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, K=Kontrolle, P=Patient*in

d) Gomori-Trichom: Die Gomori-Trichom-Färbung kann hilfreich sein, um Störungen der myofibrillären Struktur sichtbar zu machen. Die Muskelfasern und das Kollagen werden grünlich-blau angefärbt. Die Zellkerne erscheinen rot. Vakuolenbildung im Zytoplasma der Muskelfasern („rimmed vacuoles“) oder rötliche Aggregatbildungen können hinweisend für eine pathologische Veränderung sein (Abb. 9). (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2013, S. 16-18)

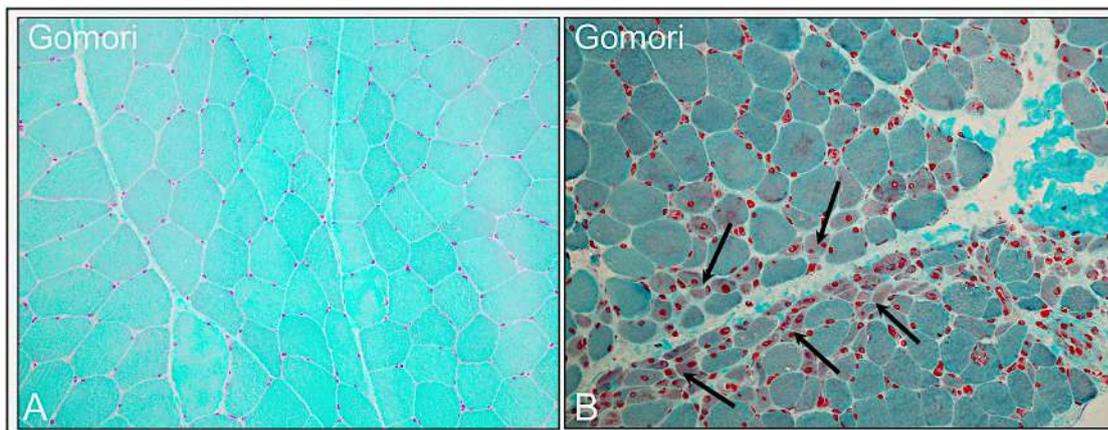


Abb. 9: Gomori-Trichom gefärbte Kryostatschnitte der gesunden Skelettmuskulatur im Vergleich zu jIIM A: Kontrolle mit gleichmäßiger Anfärbung der Muskelfasern (K4) B (jIIM): Perifaszikulär atrophe Muskelzellen mit gestörter myofibrillärer Architektur (Pfeile), zu erkennen an der rötlichen Verfärbung der Zellen (P2). Eigene Fotografien: Vergrößerung 200x. jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, K=Kontrolle, P=Patient*in

2.3.2 Immunhistochemie

2.3.2.1 Grundlagen der Immunhistochemischen Färbung

Die nachfolgend genannten Färbungen können als indirekte Immunhistochemie (IHC) beschrieben werden, die auf dem Prinzip einer Antigen-Antikörper-Reaktion basiert. Mithilfe eines Primärantikörpers können bestimmte Zielproteine gebunden und durch einen mit Farbstoff versehenen Sekundärantikörper unter einem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden. (Lüllmann-Rauch/Asan, 2019, S. 728-729; Welsch/Deller/Kummer, 2018, S. 6-8)

2.3.2.2 Primärantikörper Immunhistochemie

Die nachfolgenden Antikörper (Tab. 7) wurden für die IHC-Färbungen an 6 µm dicken Kryoschnitten am Ventana BenchMark XT verwendet. Es handelte sich um etablierte Färbungen für Muskelschnitte des Instituts für Neuropathologie in Gießen, die im Rahmen der routinediagnostischen Analysen im Neuromuskulären Labor des Instituts für Neuropathologie in Gießen durchgeführt worden sind.

Tab. 7: Primärantikörper IHC

Antikörper	Primärantikörper	Firma	Verdünnung	Zielstrukturen/ Bedeutung
MHC I	Monoclonal mouse; clone W6/32; code M0736	DAKO	1:500	<i>Major histocompatibility complex</i> I, Inflammatorischer Prozess der Muskelfaser
MHC II	Monoclonal mouse; clone CR3/43; code M0775	DAKO	1:200	<i>Major histocompatibility complex</i> II, Inflammation des Muskels
c5b-9	Monoclonal mouse; clone aE11, code M0777	DAKO	1:50	Komplementablagerungen auf den endomysialen Gefäßen oder den Muskelfasern

CD 3 vor 08/2017	Monoclonal rabbit; clone SP7; RM-9107-S0	Medac – Neomarkers	1:200	<i>Cluster of differentiation 3, T-Zell-Rezeptor</i>
CD 3 nach 08/2017	Monoclonal rabbit; Klon SP7, RBK024	Zytomed	1:200	<i>Cluster of differentiation 3, T-Zell-Rezeptor</i>
CD 8	Monoclonal mouse; clone C8/144B, code M7103	DAKO	1:500	<i>Cluster of differ- entiation 8, Zytotoxische T- Zellen</i>
CD 20	Monoclonal mouse; clone L26; code M0755	DAKO	1:100	<i>Cluster of differ- entiation 20, B- Zellen</i>
CD 68	Monoclonal mouse; clone KP1; code M0814	DAKO	1:200	<i>Cluster of differ- entiation 68, Makrophagen</i>
CD 56	Monoclonal mouse; clone 123C3, code 18-0152	Invitrogen	1:300	<i>Cluster of differ- entiation 56, Regeneration</i>
MHCD	Monoclonal mouse; clone RNMy2/9D2; NCL-MHCD	Novocastra (Leica)	1:20	<i>Developmental Myosin heavy chain, Regeneration der Muskelfasern</i>
Myotilin	Monoclonal mouse; clone RSO34; NCL-MYOTILIN	Novocastra (Leica)	1:50	Myofibrilläre Struktur
p62	Monoclonal mouse; clone 3/P62 LCK LIGAND; 610832	BD Transduction Laboratories	1:500	Autophagie- protein
LC3	Monoclonal mouse; clone 5F10; 0231-00BIOTIN/LC 3-5f10	Nanotools	1:100	<i>Microtubule- associated protein 1 light chain 3, Autophagie</i>
CD 31	Monoclonal mouse; Klon JC70A; code M0823	DAKO	1:500	<i>Cluster of differ- entiation 31, Endothelzellen</i>

Mx1/2/3 (MxA)	Polyclonal rabbit (H-285), sc-50509	Santa Cruz Biotechnology	1:100	<i>Myxovirus Resistance Protein A</i> , Induktion von Interferon Typ 1
VEGF	Monoclonal mouse (C-1), sc-7269	Santa Cruz Biotechnology	1:100	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , Vaskulogenese

2.3.2.3 Sekundärantikörper Immunhistochemie

Für die Färbungen auf dem Ventana BenchMark XT wurde das UltraView DAB Detection Kit verwendet (siehe Anhang).

2.3.3 Auswertung der Standardfärbungen, Enzymhistochemie und Immunhistochemie

Die Auswertung erfolgte von zwei erfahrenen Neuropatholog*innen, die verblindet zum klinischen Phänotyp und dem Antikörperstatus waren. Zuerst wurde orientierend an dem VAS-Score-System modifiziert nach Wedderburn et al. (2007) und Varsani et al. (2015) die Ausprägung der Muskelpathologie eingeordnet. Die Untersucher*innen beurteilten den Schweregrad auf einer Skala von null (als gesund/ nicht pathologisch) bis zehn (stark pathologisch). Diese Einschätzung des VAS-Score erfolgte anhand der vorhandenen Färbungen, insbesondere der HE und der Gomori-Trichrom-Färbung, MHC1-Expression, Vorhandensein von CD3 und CD68-Zellen, sowie Rarefizierung von CD31 (Varsani et al., 2015; Wedderburn et al., 2007).

Zusätzlich wurden die verschiedenen enzymatischen Färbungen der Muskelbiopsien bewertet. Dafür wurde eine Fünf-Punkte-Skala zur jeweiligen Schwere der Pathologie verwendet (0, 0.5, 1, 2, 3). Wobei null keine Pathologie und drei starke pathologische Ausprägung zeigte, so dass jede Färbung individuell für die Kohorte betrachtet werden konnte. In der HE-Färbung wurde die perifaszikuläre Atrophie, Punched-out-vacuoles (POV), Muskelfasernekrosen, Regeneration, Ödem und Inflammatorische Zellen beurteilt (siehe Abb. 6, Tab. 8). Bei der COX-SDH-Doppelfärbung wurde das Vorhandensein von COX-negativen Fasern beurteilt (Abb. 7, Tab. 8). Welche Zellen bei einer entzündungsbedingten Infiltration beteiligt waren, konnten durch verschiedene IHC-Färbungen zielgerichtet betrachtet werden. Dazu gehörten die Färbungen gegen

CD 3, CD 8, CD 20 und CD 68. Zudem wurde die Hochregulation von MHC1 und MHC2 auf dem Sarkolemm betrachtet. In der Färbung für c5b-9 wurden die Ablagerungen auf dem Muskelfasersarkolemm und auf den endomysialen Kapillaren ausgewertet. Myotilin, als Strukturprotein der Z-Scheiben des Sarkomers, diente als Färbung zur Detektion von myofibrillären Störungen im Muskel und zur Darstellung von Regenerationsprozessen, zusammen mit der Färbung für CD 56 und MHCD. Die CD 31 Färbung, zur Darstellung der Endothelzellen, diente zur Feststellung einer Rarefizierung der kleinen endomysialen Gefäße im Muskelgewebe. Ein vermehrter Verlust der Gefäße wurde mit einem höheren Score bewertet, ebenso Gefäßabnormitäten und Infarktbildung. Das Ausmaß der Hypoxie wurde durch die VEGF-Färbung beurteilt. Bei der MxA-Färbung wurde, neben der Stärke der Expression, eine Verteilung nach perifaszikulär betrachtet. MxA gilt als Surrogatmarker für IFN1 vermittelte Immunprozesse. Das Ausmaß der Autophagie konnte mithilfe von Färbungen gegen p62 und LC3 sichtbar gemacht werden.

Zur besseren Übersicht und Verständnis über das Bewertungssystem von den untersuchten Färbungen wurde die Mustertabelle unten eingefügt (Tab. 8). Die Abb. 10 zeigt Beispiele der verschiedenen Ergebnisse der IHC-Färbungen. Für die Fotoaufnahmen wurden das Durchlichtmikroskop und die Digitalkamera der Nikon Corporation genutzt (ausführliche Geräteliste im Anhang).

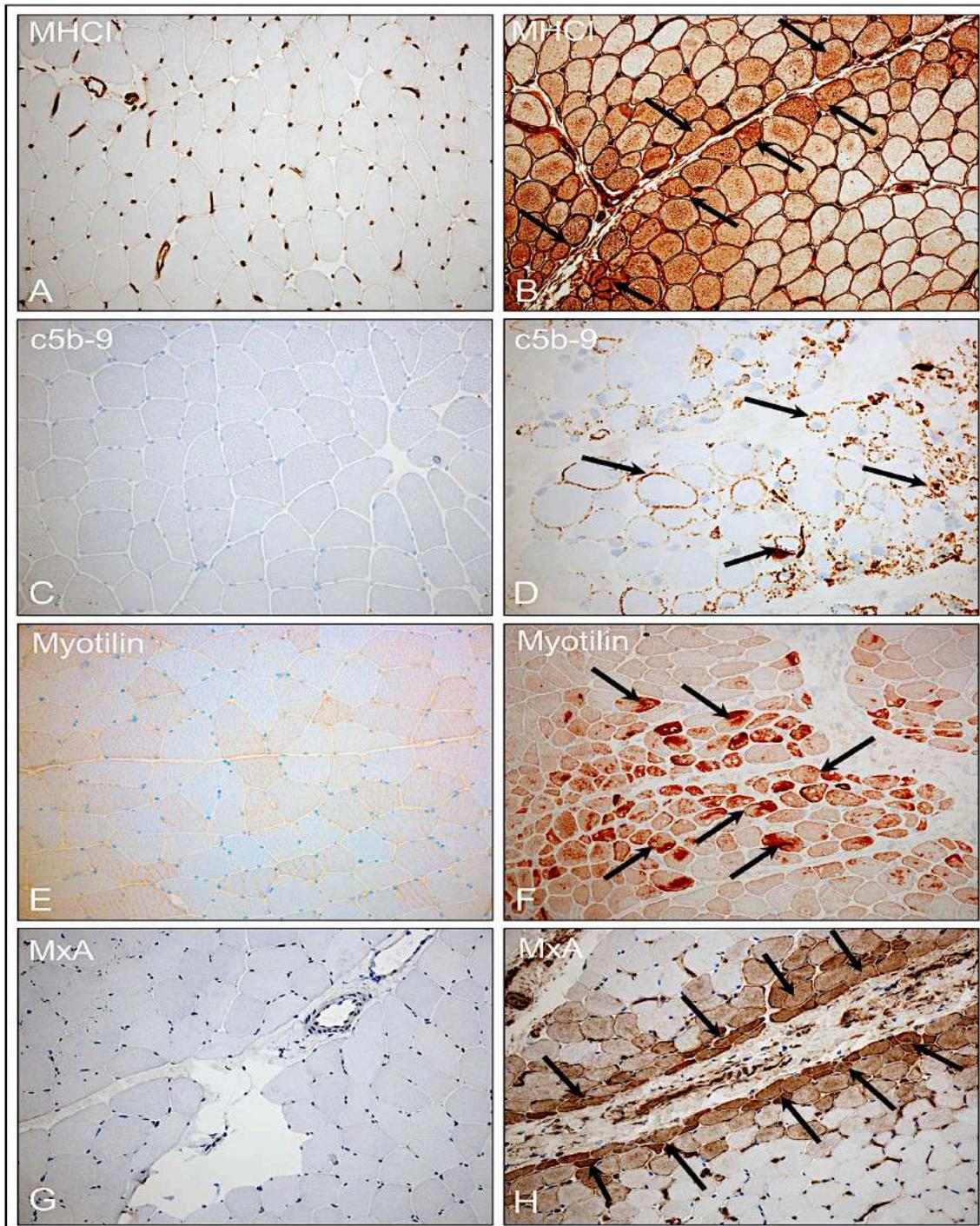


Abb. 10: Immunhistochemisch gefärbte Kryostatschnitte der gesunden Skelettmuskulatur (A, C, E, G) im Vergleich zu jIIM Morphologischer Normalbefund eines Kontrollpatienten (K4). B, D, F, H (jIIM): Bild B: Ausgeprägte ubiquitär sarkolemmale Expression von MHC1, perifaszikulär betont (P2), D: Komplementablagerungen (c5b-9) auf dem Sarkolemm und den endomysialen Kapillaren (P14), F: Gestörter myofibrillärer Aufbau erkennbar durch fleckiges Verteilungsmuster von Myotilin (P2), H: Starke Expression von MxA auf perifaszikulären Zellen (P2) Eigene Fotografien: Vergrößerung 200x. jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, K=Kontrolle, MHC=Major Histocompatibility Complex, MxA=Myxovirus Resistance Protein A, P=Patient*in

Tab. 8: Mustertabelle zum Scoring der Pathologie von Standardfärbungen, Enzymhistochemie und Immunhistochemie (modifiziert nach Wedderburn und Varsani)

Färbung	Erklärung	0	0.5	1	2	3
Hämalaun&Eosin	Histologischer Überblick					
Perifaszikuläre Atrophie	Ausmaß atropher Zellen zur Muskelfaserperipherie					
Punched-Out-Vacuoles (POV)	Ischämischer Myofibrillenverlust, Anzahl POV					
Nekrosen	Ausmaß Muskelfasernekrosen					
Regeneration	Ausmaß regenerativer Prozesse					
Ödem	Ausmaß ödematös veränderter Muskelzellen					
Inflammation	Ausmaß der Einwanderung von inflammatorischen Zellen					
Cytochromoxidase-Succinatdehydrogenase	Vorhandensein COX-negativer Fasern; mitochondrialer Defekt					
Alkalische Phosphatase	Vorhandensein perimysialer Ablagerungen					
MHC1	Ausmaß der Expression; Zunahme nach perifaszikulär					
MHC2	Ausmaß der Expression, perimysiale Aktivierung					
c5b-9	Ausmaß der Komplementaktivierung					
Sarkolemm	Sarkolemmale Expression					
Kapillaren	Hochregulation auf den endomysialen Kapillaren					
CD3	Anzahl der T-Zellen					
CD8	Anzahl zytotoxischer T-Zellen					
CD20	Ausmaß B-Zellen-Invasion					
CD56	Ausmaß regenerative Prozesse der Muskelfasern					
CD68	Anzahl Makrophagen					

CD31	Ausmaß der Rarefizierung von Endothelzellen, Verlust von Kapillaren					
MHCD	Ausmaß Regeneration der Muskelfasern, v.a. perimysial					
Myotilin	Myofibrilläre Strukturstörungen, Regenerationsprozesse					
LC3	Ausmaß Autophagie, Proteinaggregate					
p62	Ausmaß Autophagie, Proteinaggregate					
MxA	Perimysiale Expression von MxA, Zunahme nach perifaszikulär, Expression auf Muskelfasern					
VEGF	Ausmaß proangiogener Prozesse; Aktivierung der Vaskulogenese, Hypoxie, Expression auf Muskelfasern					

2.3.4 Ultrastrukturelle Auswertung

Zur Beurteilung, welche Epon-Blöcke für eine ultrastrukturelle Beurteilung geeignet sind, wurden vorab die nach Richardson gefärbten Semidünnschnitte lichtmikroskopisch (Nikon Corporation) begutachtet. Zur Einschätzung der ultrastrukturellen Pathologie wurde die Fünf-Punkte-Skala der lichtmikroskopischen Beurteilung übernommen. Verwendet wurde ein EM 109 von der Carl Zeiss AG, ausgestattet mit einer Slow-Scan CCD Kamera von TRS. Zum einem wurde die myofibrilläre Struktur des Muskels im Längsschnitt in einer 12.000-fachen Vergrößerung betrachtet und die Sarkomerstruktur, Z-Band-Alteration und Glykogenablagerungen beurteilt. Im Querschnitt wurden in 12.000-facher Vergrößerung die Mitochondrien (Aggregatbildung, Polymorphie und Einschlüsse) und die tubuloretikulären Einschlüsse in Endothelzellen und Perizyten der endomysialen Kapillaren ultrastrukturell betrachtet. Zur besseren Übersicht über das Bewertungssystem wurde die Mustertabelle unten eingefügt (Tab. 9).

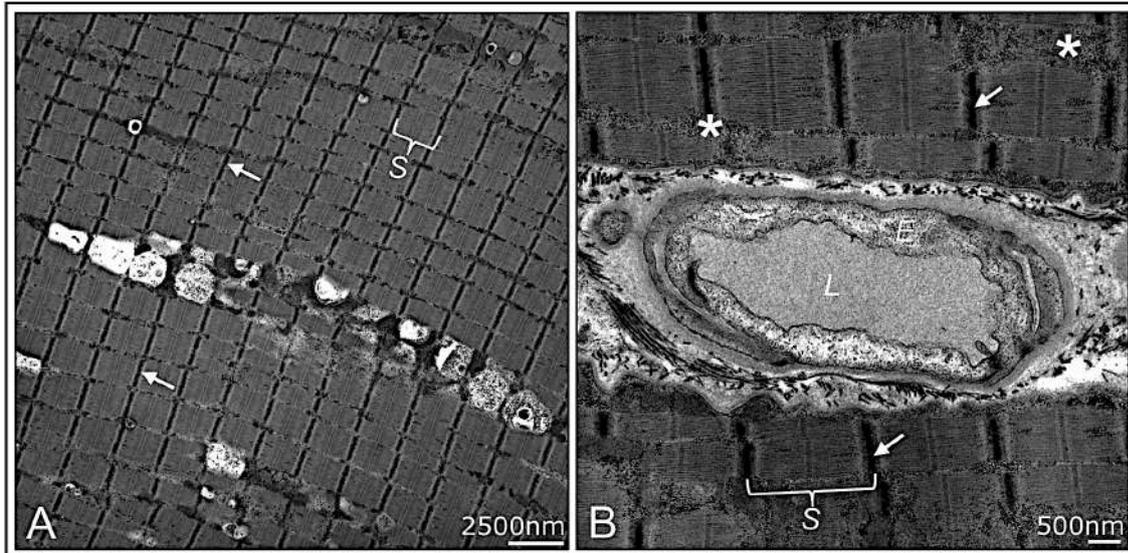


Abb. 11: Ultrastrukturelle Morphologie eines regelhaften Skelettmuskels (K5) A: Regelrechter myofibrillärer Sarkomeraufbau mit typischer Querstreifung der Muskelfasern (S), ohne vermehrte Glykogeneinlagerungen (*) oder Z-Band-Alterationen (Pfeil). B: Regelhaftes endomyociales Gefäß ohne pathologische Einschlüsse in den Endothelzellen (E). L: Gefäßlumen. Eigene Fotografien. Vergrößerung: A: 4400x B:12 000x

Tab. 9: Mustertabellen zum Scoring der ultrastrukturellen Pathologie

Ultrastrukturelle Merkmale	Erklärung	0	0.5	1	2	3
Myofibrilläre Struktur	12.000-fache Vergrößerung					
Sarkomerstruktur	Disruption der ursprünglichen Sarkomerstruktur					
Z-Band-Alteration	Disruption, Z-Band-Streaming					
Glykogenablagerungen	Ausmaß der Ablagerungen					
Mitochondrien	12.000-fache Vergrößerung					
Aggregatbildung	Clusterbildung					
Polymorphie	Variation des/r mitochondrialen Durchmessers/Größe					
Einschlüsse	Strukturstörungen, Bildung von Einschlusskörperchen					

Endomysiale Gefäßeinschlüsse	Erklärung	Anzahl
Betrachtete Gefäße (Ziel= mindestens 10 Gefäße)	Aufsuchen von mindestens 10 endomysialen Gefäßen, mindestens 20.000-fache Vergrößerung	
Einschlüsse in Endothelzellen oder Perizyten der betrachteten Gefäße	Auffinden von tubuloretikulären Einschlüssen, mindestens 20.000-fache Vergrößerung	

*Erklärung: Diese Mustertabellen wurden zur Bewertung der Ultrastruktur verwendet für ein einheitliches Scoring der Muskelbiopsien der einzelnen Proband*innen.*

2.4 Statistische Auswertung

Aufgrund der niedrigen Inzidenz von idiopathisch inflammatorischen Myopathien im Kindesalter und der folglich begrenzten Stichprobengröße ist die statistische Auswertung dieser vorliegenden Arbeit als explorative Datenanalyse zu interpretieren. Zur Unterscheidung von systematischen Auffälligkeiten zwischen den verschiedenen jIIM Gruppen und den Kontrollfällen wurde ein Kruskal-Wallis-Test (KWT) angewendet. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm RStudio Desktop 4.1.2 (2021.11.01) verwendet. Für den Großteil des Ergebnisteils erfolgte eine deskriptive Beschreibung, Teile der Ergebnisse wurden mit Hilfe von Graph PadPrism (Version 9.2.0.332) graphisch dargestellt. Für die statistische Auswertung erfolgte die Rücksprache mit dem Institut für Medizinische Informatik in Gießen.

Der Kruskal-Wallis-Test dient als Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben. Zwischen den untersuchten Gruppen wurde nach Auffälligkeiten bzw. Unterschieden gesucht. Bei niedrigen p-Werten ergeben sich Hinweise, dass sich die verschiedenen Gruppen voneinander unterscheiden. Durch einen Posthoc-Test können die Gruppen paarweise miteinander verglichen werden, in dieser Arbeit wurde der Dunn-Test durchgeführt. Weil es sich hier um eine explorative Studie handelt, wurde keine Irrtumswahrscheinlichkeit festgelegt und keine Adjustierung der p-Werte durchgeführt.

3 Ergebnisteil

3.1 Klinische Ergebnisse

3.1.1 Klinische Symptomatik der Patient*innen

In dieser Studie eingeschlossen wurden 15 Patient*innen (11 Mädchen/ 4 Jungen), die sich in der Mehrheit mit einer skelettmuskulären Symptomatik vorstellten (14/15, siehe Abb. 12). Dazu gehörte vor allem eine Schwäche der proximalen Muskelgruppen (14/15) und Muskelschmerzen (Myalgie, 11/15). 40 % der Untersuchungsgruppe klagten v.a. über belastungsinduzierte Muskelschmerzen. Die Patient*innen präsentierten verkürzte Gehstrecken, einen kraftlosen Gang, erschwertes Treppensteigen, Mühe beim Arm heben oder Dinge vom Boden aufzuheben. Sport war in den meisten Fällen nicht möglich. In schweren Fällen mussten die Arme beim Aufstehen verwendet werden (positives Gowers Zeichen, 5/15) oder ein normaler Alltag konnte nur mithilfe anderer Personen gewährleistet werden. Eine Patientin (P5) zeigte Schwierigkeiten beim Schlucken.

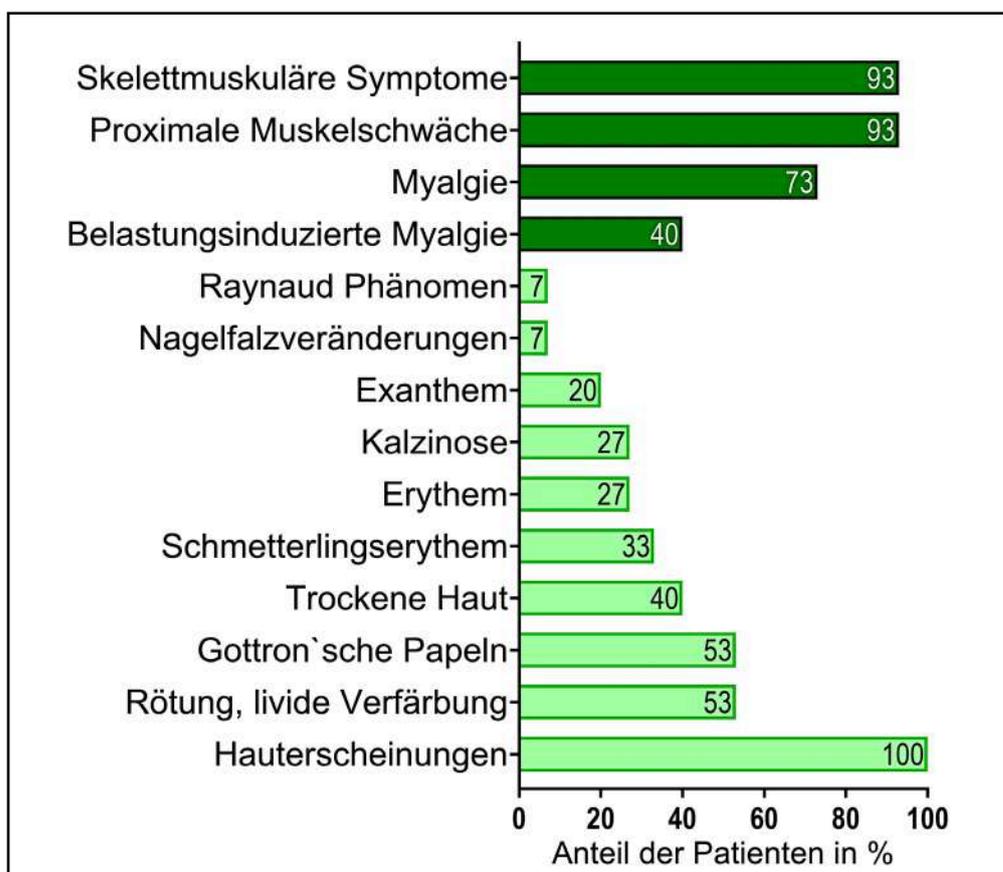


Abb. 12: Anteil von Symptomen der Skelettmuskulatur (dunkelgrün) und Hauterscheinungen (hellgrün) bei Patient*innen mit jIIM. Alle Patient*innen präsentierten Hauterscheinungen bei klinischer Vorstellung, jedoch unterschiedlichen Charakters und Ausmaßes. Eigene Abbildung erstellt mithilfe GraphPad Prism. jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie

Alle Patient*innen der Untersuchungsgruppe zeigten Hauterscheinungen zum Zeitpunkt der klinischen Vorstellung (siehe Abb. 12). Häufig waren rötliche, livide Verfärbungen (8/15), Gottron'sche Papeln (8/15) und trockene Haut (6/15). 33 % der Patient*innen präsentierten ein Schmetterlingserythem im Gesicht, 27 % zeigten ein Erythem auch an anderen Stellen. 4/15 Patient*innen stellten sich mit Kalzinosen der Haut vor. Die Ausprägung variierte von Kalzifikationen am gesamten Rumpf, Streckseiten der Arme, Oberschenkel und Waden (P8), zu lokalen Kalzifikationen an den Ellenbogen (P4), Oberschenkel (P12) und Mikrokalzifikationen von den Unterarmen und Händen (P7). Drei Patient*innen zeigten Exantheme. Eine Patientin präsentierte Nagelfalzveränderungen (P10). Bei P7 war ein Raynaud Phänomen der Finger zu beobachten. Die Abb. 13 zeigt die Hauterscheinungen von P5. Die Tab. 10 gibt einen ausführlichen Überblick über die klinischen Symptome.



Abb. 13: Hauterscheinungen einer Patientin (P5) mit jDM. Die Patientin stellte sich klinisch mit Rötungen der Oberarme, trockener Haut, einem Schmetterlingserythem (A) und Gottron'schen Papeln (B) an den Fingerknöcheln vor. Fotos: Prof. Dr. med. A. Hahn, Neuropädiatrie, UKGM. jDM=juvenile Dermatomyositis, P=Patient*in

Die Untersuchungsgruppe zeigte ein vielfältiges Bild an Begleitsymptomen (15/15). Am häufigsten (47 %) wurde eine zunehmende Müdigkeit, Leistungsminderung und Konzentrationsschwäche berichtet, zudem litten die Patient*innen unter starker Traurigkeit, Stimmungseinbrüchen und Stimmungsschwankungen (33 %). Dadurch verschlechterten sich oft die schulischen Leistungen, Freunde wurden vernachlässigt und der Spaß am Spielen ging verloren, was zu einem sozialen Rückzug führte (20 %). Neben diesen psychosozialen Beschwerden, zeigten 20 % Fieber und auch ödematöse

Einlagerungen. 2/15 der untersuchten Patient*innen zeigten Gewichtszunahme, während ein Patient (P1) das Trinken verweigerte und Appetitlosigkeit zeigte. Ein Patient (P14) nahm an Gewicht ab. Weiterhin zeigte eine Patientin arthritische Beschwerden (P10), eine beklagte Morgensteifigkeit (P13). Ein Patient (P3) präsentierte eine ausgeprägte Lymphadenopathie. Eine Patientin (P11) beklagte vermehrten Nachtschweiß (Abb. 14).

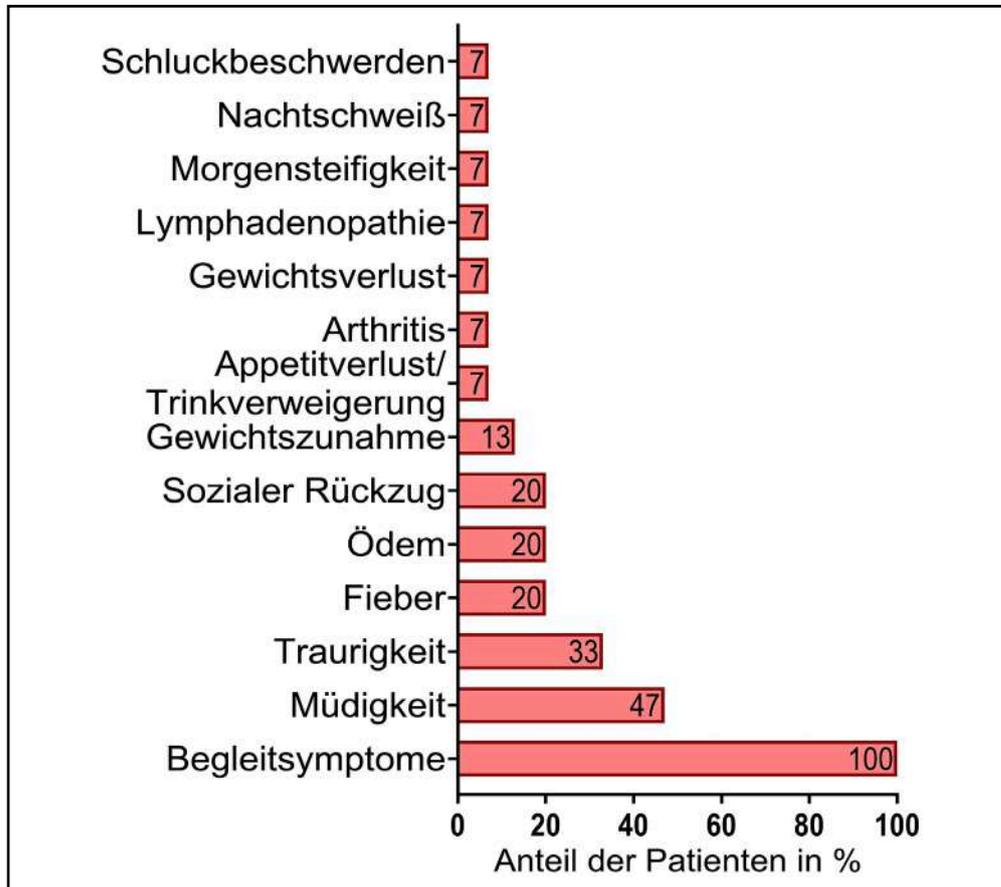


Abb. 14: Begleitsymptome bei Patient*innen mit jIIM Alle Patient*innen zeigten Symptome zusätzlich zu der skelettmuskulären Symptomatik und den Hauterscheinungen. Eigene Abbildung erstellt mithilfe GraphPad Prism. jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie

Einige Patient*innen (33%) zeigten neben den skelettmuskulären Symptomen, die für eine IIM typisch sind, extramuskuläre Manifestationen. Eine kardiale Beteiligung trat bei 27 % der untersuchten Personen auf. Darunter zählten drei Patient*innen mit der Diagnose einer jDM (Perikarderguss (P1), Mitralinsuffizienz (P5), Trikuspidalinsuffizienz (P12)) und eine Anti-Jo1-positive Patientin (P14) mit Mitralinsuffizienz und Rechtsherzbelastung. Weiterhin präsentierten 3/15 der Patient*innen auch pulmonale Beteiligung, u.a. zeigten zwei Personen mit der Diagnose einer jDM eine pulmonale Restriktion (P1, P4). Ein Patient (P10) mit jDM litt bei der klinischen Aufnahme unter einer Pneumonie.

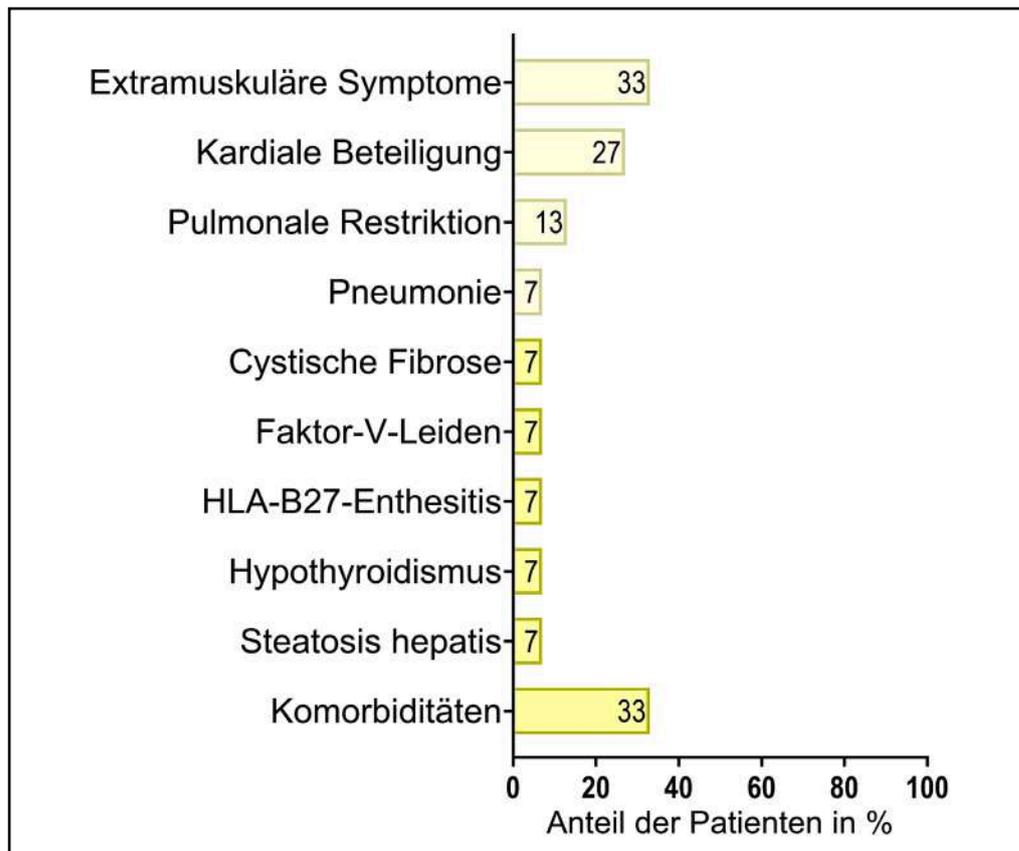


Abb. 15: Prozentualer Anteil der extramuskulären Symptome (hellgelb) und Komorbiditäten (dunkelgelb) bei Patient*innen mit jIIM Eine kardiale Mitbeteiligung war dabei häufiger als eine pulmonale Beteiligung. *Eigene Abbildung erstellt mithilfe GraphPad Prism. jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie*

Bei fünf Patient*innen waren vor der Diagnosestellung einer kindlichen IIM bereits weitere Vorerkrankungen bekannt. Dazu zählten Steatosis hepatis (P1), Hypothyreose (P3), Faktor-V-Leiden-Mutation (P5), Cystische Fibrose (P9) und HLA-B27-Enthesitis. Der Verlauf der Symptome wurde von allen Patient*innen als subakut beschrieben.

3.1.2 Muskelbiopsie

Zur Sicherung der genauen Diagnose wurde bei allen Patient*innen eine Muskelbiopsie entnommen und mit dem Verdacht einer juvenilen Dermatomyositis oder anderen IIM zur weiteren histologischen Beurteilung im Institut für Neuropathologie in Gießen untersucht. Zwei Patientinnen standen zum Zeitpunkt der Biopsie unter immunsupprimierender Therapie (P4 und P13). Bei allen Patient*innen bis auf P13 wurde die Biopsie aus der Muskelgruppe der *Mm. quadriceps femoris* entnommen. Bei P13 entschied man sich für den *M. deltoideus*. Neben den klinischen Untersuchungen und der Muskelbiopsie fiel die weiterführende Diagnostik jedoch unterschiedlich aus. Die Tab.

10, 11 und 12 geben einen ausführlicheren klinischen Überblick der einzelnen Patient*innen.

3.1.3 Laborparameter

Alle Patient*innen erhielten bei der klinischen Aufnahme eine Blutentnahme. Auffällig zeigte sich bei fast allen Fällen (93 %) die Erhöhung der Kreatinkinase (CK, Abb. 16). Die Laktatdehydrogenase (LDH) war in 73 % der Fälle erhöht. Keiner der Untersuchungsgruppe zeigte eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins. Bei genauerer Betrachtung der Transaminasen waren bei 73 % die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und bei 47 % die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) erhöht. Die detaillierten Befunde sind in der Tab. 12 aufgelistet.

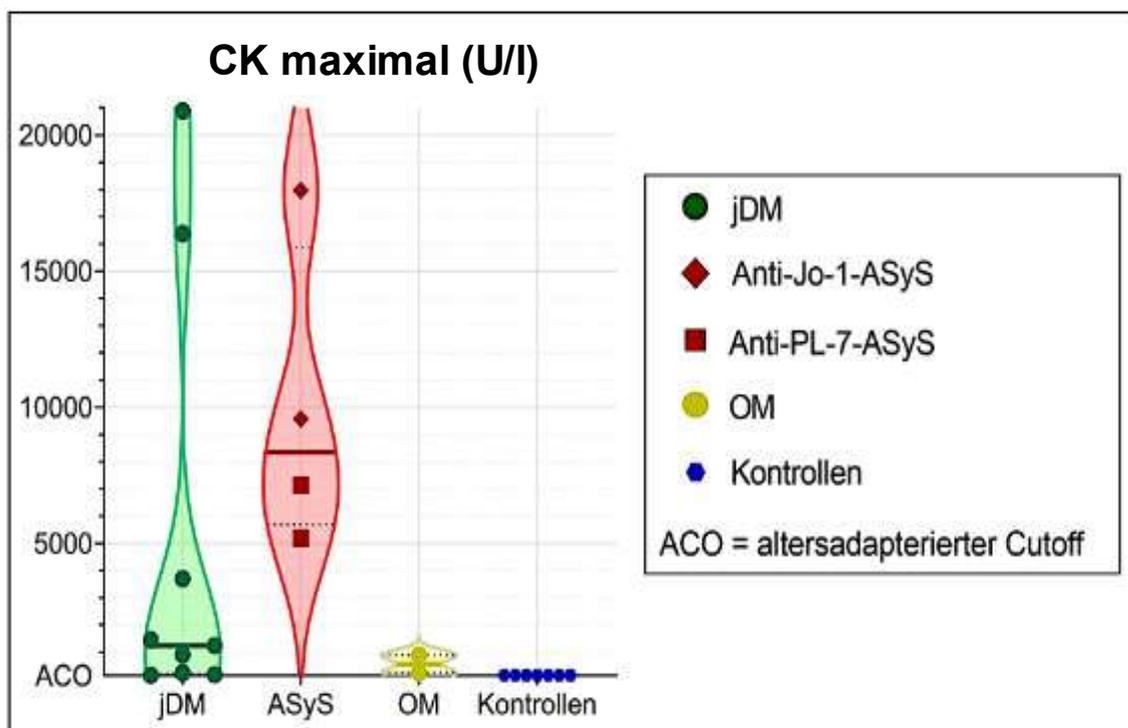


Abb. 16: Violin plot zur Darstellung der Serum-Kreatinkinase (CK) bei jIIM im Vergleich zur Kontrollgruppe Jeder Punkt steht für eine Person der Untersuchungs- und Kontrollgruppe. Dazu wurde die mediane Verteilung ermittelt. Den höchsten Anstieg der CK zeigte die Gruppe der ASyS, v.a. die Patient*innen mit Anti-Jo1-ASyS. Die Kontrollen zeigten keine Erhöhung der CK. Der Cutoff (ACO) für eine CK-Erhöhung wurde durch alters- und geschlechtsspezifische Referenzwerte für Kinder und Jugendliche bestimmt. Eigene Abbildung erstellt mithilfe GraphPad Prism. ASyS=Antisynthetasesyndrom, CK=Kreatinkinase, jDM= Juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, OM=Overlapmyositis

3.1.4 Apparative Diagnostik bei Patient*innen mit jDM

Die apparative Diagnostik wurde nicht bei allen Proband*innen durchgeführt. Eine MRT der betroffenen Skelettmuskulatur wurde bei 11/15 der Personen durchgeführt. Davon zeigten 8/11 einen Befund, der sich mit der Diagnose einer Myositis vereinbaren lässt. 6/11 zeigten ein Ödem und 4/11 fielen mit Kontrastmittelanhebung und/oder Signalverstärkungen auf. Bei zwei der untersuchten Patient*innen handelte es sich laut radiologischer Einschätzung um einen Normalbefund.



Abb. 17: MRT der Oberschenkelmuskulatur in T1 Sequenz einer Patientin (P4) mit NXP2-positiver jDM Zum Zeitpunkt der klinischen Präsentation (A) zeigte sich eine Kontrastmittelanreicherung und ein proximal diffuses symmetrisches Muskelödem, vor allem in den Oberschenkeln, vereinbar mit einer Myositis. Die weiteren Bilder zeigen die Oberschenkelmuskulatur nach sechs Monaten (B) und nach zwölf Monaten immunsupprimierender Therapie (C). MRT: Prof. Dr. med. A. Hahn, Neuropädiatrie, UKGM. jDM=juvenile Dermatomyositis, P=Patient*in

Einen muskuloskelettalen Ultraschall erhielten 9/15 der Patient*innen. Mit einer Myositis vereinbar zeigten sich 6/9 der durchgeführten Sonografien. Ebenfalls sechs der Proband*innen präsentierten Echoanhebungen/Signalverstärkungen im Ultraschall. 3/9 der Patient*innen zeigten ein muskuläres Ödem. Zudem wurde bei 11/15 der Patient*innen eine EMG der proximalen Muskulatur durchgeführt. In der Regel wurden der *M. deltoideus* oder *M. vastus lateralis* untersucht. Die Mehrheit der untersuchten Patient*innen (8/11) zeigte ein myopathisches EMG, vereinbar mit einer Myositis. Auffällig waren niedrige Amplituden, kurze polyphasische Potentiale und nur wenig/moderate Spontanaktivität der Muskeln. Die restlichen drei untersuchten

Proband*innen zeigten elektromyographisch nur leichte Myositiszeichen. Die Tab. 11 führt die apparativen Befunde der einzelnen Patient*innen im Detail auf. Die Abb. 17 zeigt einen typischen MRT Befund einer Anti-NXP2-positiven Patientin mit jDM (P4).

3.1.5 Analyse der Serumantikörper bei Patient*innen mit jIIM

Bei 13/15 der untersuchten Proband*innen wurde eine Autoantikörper-Diagnostik des Serums durchgeführt. Diese beinhaltete unter anderem die Antinukleären Antikörper (ANA, 69 % positiv, 9/13) und Doppelstrang-DNS-Antikörper (dsDNS-Ak, 8 % positiv, 1/13). Smith-Antikörper (Sm-AK) gelten als hochspezifische Antikörper (AK) für einen systemischen Lupus erythematodes (SLE) und wurden bei 12/15 der Patient*innen untersucht (8 % positiv, 1/13). Anti-RNP/Sm, spezifisch für SLE und Mischkollagenosen, wurde ebenfalls bei 12/15 der Patient*innen untersucht (17 % positiv, 2/12). SLE spezifische AK und AK assoziiert mit Mischkollagenosen sind hinweisend für die Diagnose einer OM. Diese waren bei zwei Patient*innen der Untersuchungsgruppe zu finden.

Ein erweitertes Myositis- und Myopathieprofil wurde bei 12/15 der Patient*innen zur Detektion u.a. von Myositis-spezifischen-Antikörpern (MSA) und Myositis-assoziierten-Antikörpern (MAA) untersucht. 50 % der untersuchten zwölf Patient*innen zeigten MSA, davon zwei Anti-NXP2, entsprechend einer jDM, und vier Patient*innen zeigten positive Antikörper für ein Antisynthetasesyndrom (ASyS, 2/12 Anti-Jo1, 2/12 Anti-PL7). Außerdem zeigten zwei Patient*innen MAA (1/12 Anti-Ro52, 1/12 Anti-PM75), die zwar hinweisend für eine Myositis sind, aber differentialdiagnostisch keine Bedeutung haben. Eine Patientin präsentierte zudem AK gegen DFS70, die mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht werden, deren Nachweis nicht spezifisch beweisend für ein Erkrankungsbild ist.

Die Tab. 12 gibt eine ausführliche Ansicht der Antikörperuntersuchungen.

Tab. 10: Klinische Befunde bei jIIM

	D	G	A	Biopsie- entnah- mestelle	Immun- suppres- sion	Verlauf	My- algie	Proxi- male Muskel- schwä- che	Hauterscheinungen	Begleitsymptome	Extra- muskuläre Symptome	Komorbi- ditäten
P1	jDM	m	9	MQF	-	subakut, 4 Wochen	+	+	Exanthem auf Oberschenkeln und Oberarmen	Appetitverlust, Trinkverweigerung, Sozialer Rückzug, Gewichtszunahme	Pulmonale Restriktion, Perikard- erguss	Steatosis hepatis
P2	jDM	w	5	MQF	-	chronisch, Erstmani- festation 2004, Rückfall 2010	-	+	Exanthem/ livide Rötung auf Nase,	Leistungsminderung, Konzentrations- schwäche	-	-
P3	OM (SLE)	m	13	MQF	-	subakut	+	+	Gottron'sche Papeln	inguinale Lymphadenopathie	-	Hypo- thyroidismus

P4	jDM (NXP2)	w	9	MQF	Kortison- stoß- therapie	subakut, 8 Wochen	+	+	Trockene, rötliche Stellen an Knöchel, Knie und Ellenbogen	Traurigkeit, sozialer Rückzug	Pulmonale Restriktion	-
P5	jDM	w	13	MQF	-	subakut	+	+	Rötliche Verfärbung der Nasenwurzel, Kalzinose an Ellenbogen, trockene Haut	Schluckbeschwerden, Traurigkeit	Mitralin- suffizienz	Faktor-V- Leiden Mutation
P6	ASyS (PL7)	w	7	MQF	-	subakut	-	+	Trockene gerötete Haut, Schmetterlings- erythem, Erythem auf Stirn und Oberarmen, Gottron'sche Papeln	Fieber, Traurigkeit, Stimmungseinbruch	-	-

P7	OM (SLE)	m	11	MQF	-	chronisch über 4 Jahre (Flücht- lingsfamilie aus Syrien, verspätete Therapie)	+	+	Trockene Stellen der Ellenbogen- streckseiten, Exanthem auf Brustkorb und den Armen, Erythem auf Wangen, Gottron'sche Papeln	Leistungsminderung	-	-
P8	ASyS (Jo1)	m	6	MQF	-	subakut	-	-	Trockene Haut an Ellenbogen- streckseite, Schmetterlings- erythem, Raynaud- Phänomen, Gottron'sche Papeln, Mikrokalzifikationen an den Unterarmen und den Händen	Stimmungseinbruch und -schwankungen	-	-

P9	ASyS (PL7)	w	17	MQF	-	subakut, 2,5 Monate	+	+	Rötungen der Unterarme und Ellenbogen, Gottron'sche Papeln, Kalzinosen am Rumpf, Oberschenkel und Streckseiten der Arme	Müdigkeit, Leistungs- minderung	-	Cystische Fibrose (schwere exo- und endokrine Insuffizienz, CF-Hepato- pathie)
P10	jDM	w	3	MQF	-	keine Information	+	+	Gottron'sche Papeln	Fieber, Arthritis	Pneumonie	-
P11	jDM	w	5	MQF	-	subakut, 4 Monate	+	+	Rötung der Wangen, Gottron'sche Papeln, Nagelfalzver- änderungen	Nachtschweiß, Ödeme an den Lidern und Oberarmen, Gewichtszunahme	-	-
P12	jDM	w	6	MQF	-	subakut	+	+	Schmetterlings- erythem	Sozialer Rückzug	Trikus- pidal- insuffizienz	-

P13	jDM (NXP2)	w	16	MD	Kortison- stoß- therapie	subakut	+	+	Trockene Stellen an Ellenbogen und Knie, Kalzinose am linken lateralen Oberschenkel	Morgensteifigkeit, Gelenkschwellungen, Müdigkeit, Leistungs- minderung	-	HLA-B27 Enthesitis
P14	ASyS (Jo1)	w	3	MQF	-	subakut 4-5 Wochen	-	+	Erythem und rötliche Veränderungen an Gelenken	Gewichtsverlust, Müdigkeit, Leistungs- minderung	Mitralin- suffizienz, Rechtsherz- belastung	-
P15	jDM	w	8	MQF	-	keine Information	+	+	Livide Verfärbung periokulär, Stirn und Kinn, Rötung von den Händen, Füßen und Knie, Gottron'sche Papeln	Fieber, Ödeme (Gesicht, Abdomen, Gelenke), Stimmung- einbruch Konzentrations- schwierigkeiten	-	-

Erklärung: A=Alter bei Biopsie in Jahren, ASyS=Antisynthetasesyndrom, CF=Cystische Fibrose, D=Diagnose, G=Geschlecht, HLA=Humanes Leukozytenantigen, jDM=juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, MD=Musculus deltoideus, MQF=Musculus quadriceps femoris, m=männlich, P=Patient*in, SLE=Systemischer Lupus erythematoses, w=weiblich

Tab. 11: Übersicht der apparativen Diagnostik bei jHM

	Diagnose	MRT	EMG		Ultraschall
		Befunde	Lokation	Befunde	Befunde
P1	jDM	Mit einer Myositis vereinbar, v.a. in den geraden Bauchmuskeln, autochthoner Rückenmuskulatur, Glutealmuskulatur, M. quadriceps femoris und den Unterschenkelextensoren.	M. deltoideus	Spontanaktivität in moderater Ausprägung, mehrere zumeist niedrigamplitudige, leicht polyphasische Potentiale mit kurzer Dauer. Befund ist gut mit einer DM vereinbar.	Muskelsonographie war vereinbar mit den MRT-Ergebnissen. Ödem und Hyperintensität der betroffenen Muskulatur.
P2	jDM	Proximal betontes mildes Ödem in der Oberschenkelmuskulatur. Mildes Enhancement nach Kontrastmittelapplikation.	M. deltoideus, M. vastus lateralis	Deutlich myopathisches EMG mit zahlreichen kleinen und polyphasischen Potentialen von eher kurzer Dauer. Keine pathologische Spontanaktivität.	Grobe Textur mit angehobener Echogenität.
P5	jDM	n.a.	M. deltoideus, M. triceps brachii, M. biceps brachii, M.	Stark polyphasische Einzelpotentiale mit kleiner vorzeitiger Interferenz.	n.a.

			vastus lateralis and medialis	Pathologische Spontanaktivität (geringer in der Beinmuskulatur). Mit einer entzündlichen Muskelerkrankung zu vereinbaren, v.a. in der proximalen Muskulatur.	
P10	jDM	n.a.	n.a.	n.a.	Vereinbar mit einer Myositis.
P11	jDM	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
P12	jDM	Deutliche Signalalterationen und Ödem in allen Muskeln der unteren Extremität. Gut vereinbar mit einer DM.	M. deltoideus	Starke myopathische Veränderungen mit gering ausgeprägter Spontanaktivität und dichtem Interferenzmuster. Vereinbar mit Myositis.	n.a.
P15	jDM	Symmetrisches Ödem vereinbar mit DM.	M. deltoideus	Ausgeprägter myopathischer Prozess mit mäßiggradiger Spontanaktivität.	Echoanhebungen in der Unterschenkelmuskulatur.
P4	jDM, (NXP2)	Symmetrisch proximale Ödeme der Muskeln. Keine fettige Atrophie, was gegen eine Dystrophie spricht. Vereinbar mit Myositis.	M. deltoideus, M. vastus lateralis	Deutliche myopathische Veränderungen mit Vorherrschen von polyphasischen Potentialen, niedriger Amplitude und verkürzter Dauer, vorzeitiges Rekrutment bei stärkerer Willkürinnervation und	Inhomogene Verteilung innerhalb der betroffenen Muskeln bei gut darstellbaren Septen, Epimysien und

				dichtes amplitudengemindertes Muster bei maximaler Willkürinnervation, gut vereinbar mit Myositis.	Knochenechos typisch für proximal betonte Myositis.
P13	jDM, (NXP2)	n.a.	M. deltoideus	Myopathisches EMG vereinbar mit einer DM/PM.	Inhomogene, echoreiche Beschaffenheit der Muskeln, vereinbar mit einer Myositis.
P8	ASyS (Jo1)	Typischer Befund einer Myositis mit symmetrisch ausgeprägter ödemäquivalenter Signalalteration sämtlicher erfasster Muskelgruppe, v.a. Mm. quadriceps femoris (insbesonder M. vastus lateralis Und intermedius), sowie beidseits Mm. iliopsoas.	n.a.	n.a.	Zahlreiche flauere, flockige Echogenitätserhöhungen, zum Teil mit Aufhebung der streifigen Muskelfiederung. Vor allem im Bereich der Vastus-Gruppe und in den Unterschenkeln.
P14	ASyS (Jo1)	Ausgeprägte Muskelfaserpathologie. Gut vereinbar mit einer immunvermittelten Myositis wie der DM.	n.a.	n.a.	Echoreich und inhomogen verwaschen. Vereinbar mit einer Myositis.

P6	ASyS (PL7)	Beidseits ubiquitär in allen Muskelgruppen diffuse kleine Signalanhebungen mit Kontrastmittelanreicherung, vereinbar mit Dermatomyositis.	M. deltoideus	Keine pathologische Spontanaktivität, Darstellung von mehreren Potenzialen motorischer Einheiten mit auffallend niedriger Amplitude und kurzer Dauer, aber keine eindeutige Polyphasie, leicht myopathischer Umbau, aber nicht typisch für DM/PM.	n.a.
P9	ASyS (PL7)	Normal	M. deltoideus	In Ruhe keine pathologische Spontanaktivität, dichtes Interferenzmuster bei maximaler Willkürinnervation, vereinzelt Potenziale mit leichter Polyphasie, kein typischer Befund einer Myositis.	Leichte Echoanhebung der gesamten proximalen Muskulatur, Betonung des Schultergürtels und der proximalen Oberarmmuskulatur, hier auch ödematöse Veränderungen, gut vereinbar mit DM/PM.
P3	OM (SLE)	Normal	M. deltoideus	Geringe Spontanaktivität, deutlich myopathische Veränderungen in Form von Potentialen mit kurzer Dauer, eher niedriger Amplitude und deutlich vermehrter Polyphasie.	n.a.

P7	OM (SLE)	Flaue fleckige Ödeme mit korrespondierender Kontrastmittelanreicherung im M. vastus lateralis und M. rectus femoris links passend zu einer Myositis.	M. deltoideus	Keine pathologische Spontanaktivität, aber einzelne Potenziale motorischer Einheiten mit vermehrter Polyphasie, niedriger Amplitude und kurzer Dauer, nicht charakteristisch für eine DM/PM.	n.a.
----	-------------	--	---------------	--	------

*Erklärung: ASyS=Antisynthetasesyndrom, DM=Dermatomyositis, EMG=Elektromyographie, jDM=juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, M.=Musculus, MRT=Magnetresonanztomographie, n.a.=nicht analysiert, OM=Overlapmyositis, P=Patient*in, PM=Polymyositis, SLE=Systemischer Lupus erythematoses*

Tab. 12: Laborparameter und Analyse der Antikörper bei jIIM

	Diagnose	Geschlecht	Alter bei Biopsie (Jahre)	CK initial (U/l)	CK maximal (U/l)	LDH (U/l)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	ANA	dsDNS (U/ml)	MSA	MAA	andere
P1	jDM	m	9	3697	3697	746	256	138	<1:80	-	-	-	-
P2	jDM	w	5	177	177	336	-	-	1:160	-	-	-	-
P5	jDM	w	13	239	239	423	28	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
P10	jDM	w	3	10696	20893	1152	951	336	<1:80	-	n.a.	n.a.	n.a.
P11	jDM	w	5	903	903	-	98	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
P12	jDM	w	6	775	1245	415	68	-	1:640	-	-	-	-
P15	jDM	w	8	16384	16384	1505	633	193	<1:80	-	-	-	-
P4	jDM (NXP2)	w	9	1454	1454	525	-	-	1:160	-	NXP-2	PM75	-
P13	jDM (NXP2)	w	16	-	-	-	-	-	1:640	-	NXP-2	-	DFS70
P8	ASyS (Jo1)	m	6	17973	17973	398	84	-	1:320	-	Jo-1	-	-
P14	ASyS (Jo1)	w	3	9574	9574	-	412	1320	>1:10240	-	Jo-1	-	-
P6	ASyS (PL7)	w	7	2894	5200	498	143	110	1:100	-	PL-7	Ro52	-
P9	ASyS (PL7)	w	17	6700	7142	867	1159	321	<1:80	-	PL-7	-	-
P3	OM (SLE)	m	13	886	886	341	83	50	>1:10240	206,54	-	-	nRNP/Sm-AK Sm-AK
P7	OM (SLE)	m	11	237	237	-	-	-	>1:10240	-	-	-	nRNP/Sm-AK

Erklärung: Bei den Laborwerten handelt es sich um alters- und geschlechtsadaptierte Werte. ANA=Antinukleäre Antikörper, ASyS=Antisynthetasesyndrom, CK=Kreatinkinase, dsDNS=Anti-Doppelstrang-DNS, GOT=Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT=Glutamat-Pyruvat-Transaminase jDM=juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, LDH=Laktatdehydrogenase, m=männlich, MAA=Myositis-assoziierte-Antikörper, MSA=Myositis-spezifische-Antikörper, n.a.=nicht analysiert, OM=Overlapmyositis, w=weiblich, - = Wert im Normbereich/nicht pathologisch

3.2 Muskelpathologie bei Patienten mit jIIM

3.2.1 Auswertung der histomorphologischen Veränderungen und Entzündungszeichen

Mithilfe eines modifizierten VAS-Score nach Wedderburn et al zeigte sich eine hohe Heterogenität der pathologischen Ausprägung in allen Subgruppen. Am schwersten betroffen, mit einem Ergebnis von neun von zehn, waren ein Fall mit Anti-NXP2-positiver jDM (P4) und ein Fall mit Anti-Jo1-positiven ASyS (P14). Im Median zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede des VAS-Score zwischen DM (=4), ASyS (=3) und OM (=5). Die Kontrollen zeigten einen morphologischen Normalbefund (VAS-Score=0) (Abb. 18).

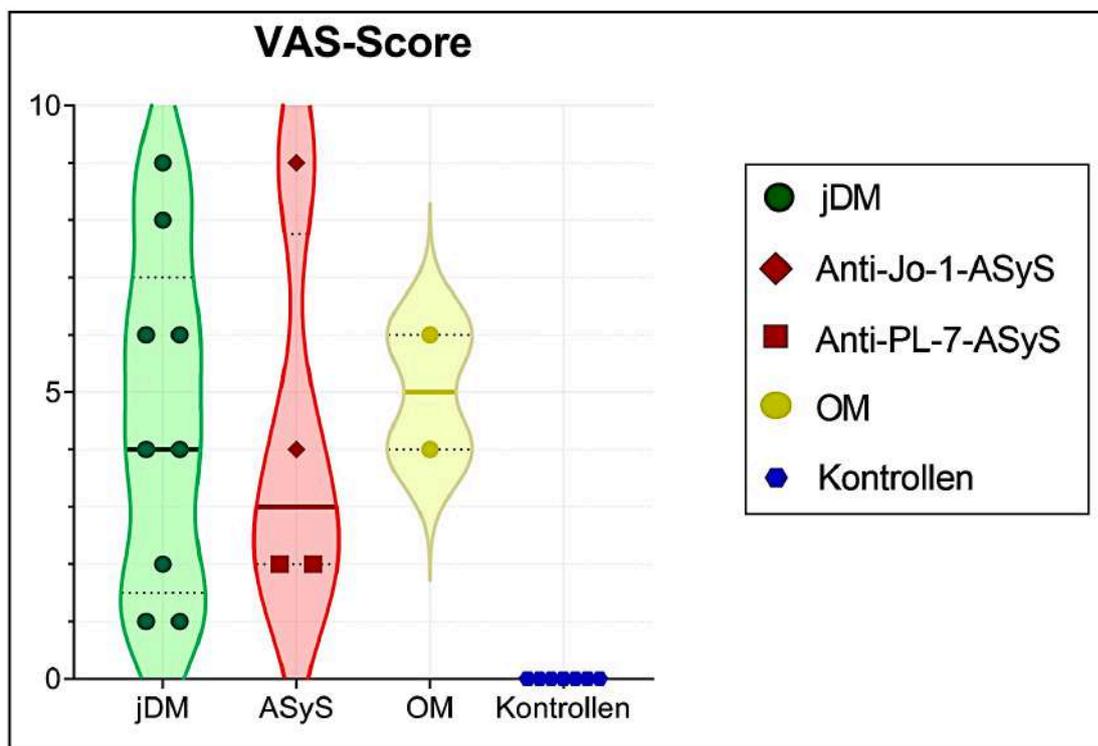


Abb. 18: Ausgeprägte histomorphologische Veränderungen mit hohem VAS-Score bei jIIM im Vergleich zur Kontrollgruppe Violin Plots zur Verteilung der einzelnen betrachteten Fälle (einzelne Punkte) der Untersuchungs- und Kontrollgruppe. Zusätzlich wurde der Median der Gruppen bestimmt (dicker Querstrich). Die stärkste Pathologie zeigten P4 und P14. Eigene Abbildung erstellt mithilfe GraphPad Prism. ASyS=Antisynthetasesyndrom, jDM= Juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, OM=Overlapmyositis, VAS=Visuelle Analogskala

3.2.2 Statistische Auswertung des VAS-Score

In dieser Arbeit wurde mithilfe eines KWT der VAS-Score untersucht, ob Hinweise auf systematische Unterschiede zwischen der jDM, der Anti-Jo1-ASyS, der PL7-ASyS, der OM und der Kontrollgruppe bestehen. Ein niedriger p-Wert ist in dieser explorativen Untersuchung ein Indiz dafür, dass sich die Gruppen unterscheiden. Als Ergebnis des KWT zeigte sich ein p-Wert von 0.0036 was darauf hinweist, dass die Gruppen ungleich voneinander sind. Woraufhin sich die Frage stellt, zwischen welchen Gruppen systematische Unterschiede bestehen. Mithilfe des Dunn-Tests wurden die Gruppen paarweise untersucht (siehe Tab. 13). Die Analyse zeigte einen Trend, dass die Gruppen jDM, Anti-Jo1-ASyS und OM sich zu der Kontrollgruppe unterscheiden (niedriger p-Wert). Jedoch zeigten die p-Werte zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen höhere Werte, sodass sich bei diesen Fällen kein Hinweis auf systematische Unterschiede ergab. Es scheint, dass der VAS-Score sich nicht systematisch zwischen den Untersuchungsgruppen unterscheidet, jedoch bestehen Hinweise auf einen Unterschied zwischen den jDM, Anti-Jo1-ASyS, OM und der Kontrollgruppe. Aufgrund der Gruppengröße (jeweils nur zwei Individuen in Gruppe zwei bis vier) sind diese Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren.

Tab. 13: Paarweise Untersuchung mithilfe des Dunn-Tests

Gruppen	jDM n=9	ASyS (Jo1) n=2	ASyS (PL7) n=2	OM n=2
ASyS Jo1 n=2	0,2692	-	-	-
ASyS PL7 n=2	0,2135	0,1353	-	-
OM n=2	0,3963	0,3915	0,2043	-
Kontrollen n=7	0,0003	0,0030	0,0847	0,0081

Erklärung: Der Dunn-Test wurde zur paarweisen Untersuchung der Gruppen durchgeführt. Ein niedriger p-Wert (fett gedruckt Werte) ist hinweisend dafür, dass sich diese Gruppen voneinander unterscheiden.. ASyS=Antisynthetasesyndrom, jDM=juvenile Dermatomyositis, OM=Overlapmyositis

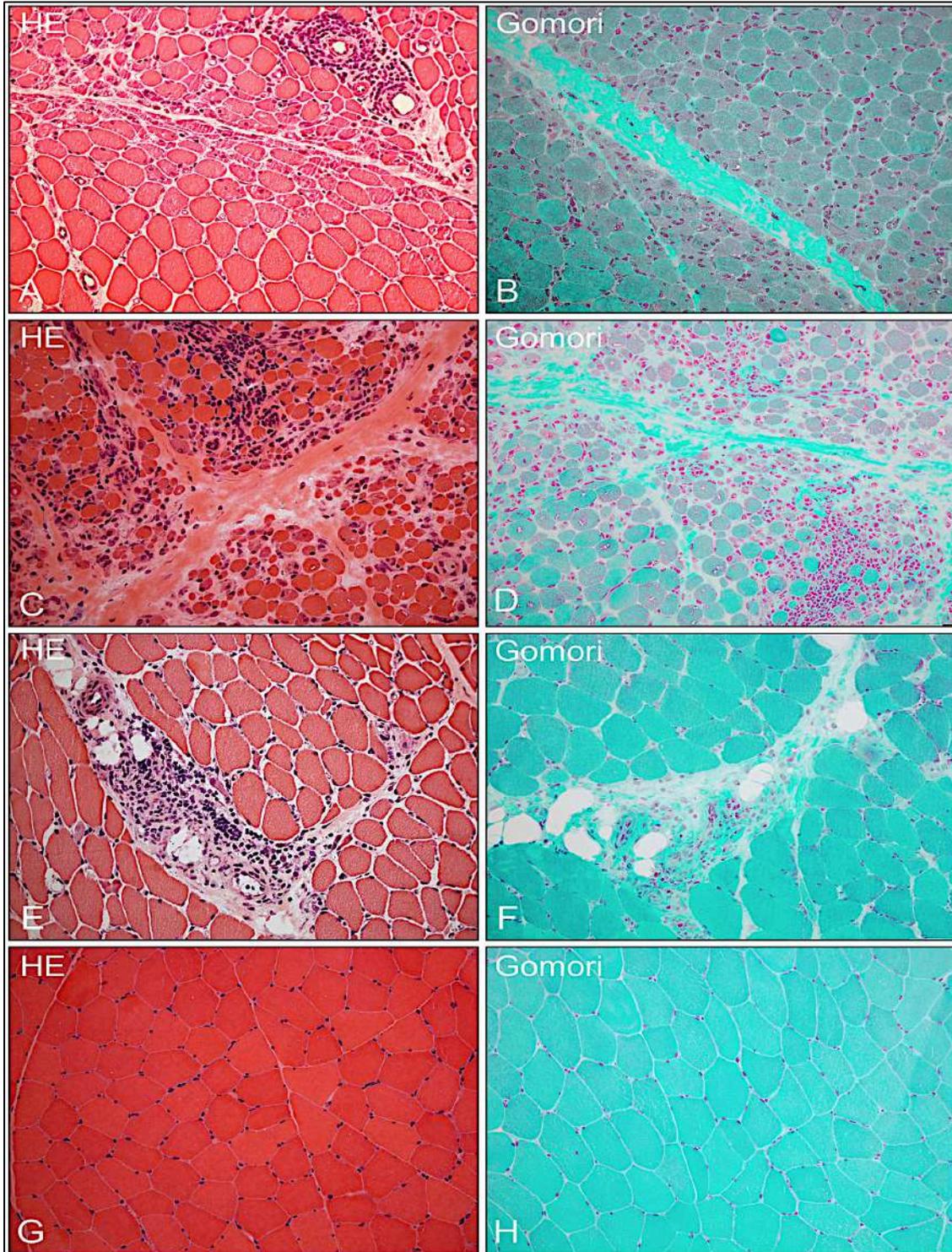


Abb. 19: Hämalau-Eosin und Gomori-Trichom-Färbungen bei jIIM (A - F) im Vergleich zu Kontrollen (K4; G+H) V.a. Biopsien mit jDM (P4; A+ B) und Anti-Jo1-ASyS (P14; C+D) zeigten eine PA und POV. Nekrosen, Ödem und Inflammation waren auch bei den anderen IIM, wie z.B. OM (P3; E+F), zu finden. Eigene Fotografien: Vergrößerung 200x. ASyS= Antisynthetasesyndrom, jDM= Juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, K=Kontrolle, OM=Overlapmyositis, P=Patient*in, PA=perifaszikuläre Atrophie POV=Punched-Out-Vacuoles

In den Färbungen mit HE und Gomori-Trichom zeigten sich perifaszikuläre Atrophie und POV vor allem in Biopsien von Patient*innen mit jDM und ASyS. Ein Fall mit OM präsentierte eine leichte perifaszikuläre Atrophie (P3). Nekrotische Fasern, Ödembildung und Regeneration war jedoch bei allen IIM zu finden. Jede Biopsie präsentierte vermehrt Entzündungszellen. Bei der immunhistochemischen Subtypisierung der inflammatorischen Zellen handelte es sich hauptsächlich um T-Zellen (CD3, CD8) und Makrophagen (CD68). In vereinzelten Fällen zeigte sich auch eine Invasion von B-Zellen (CD20). (Abb. 19, 20, Tab. 16)

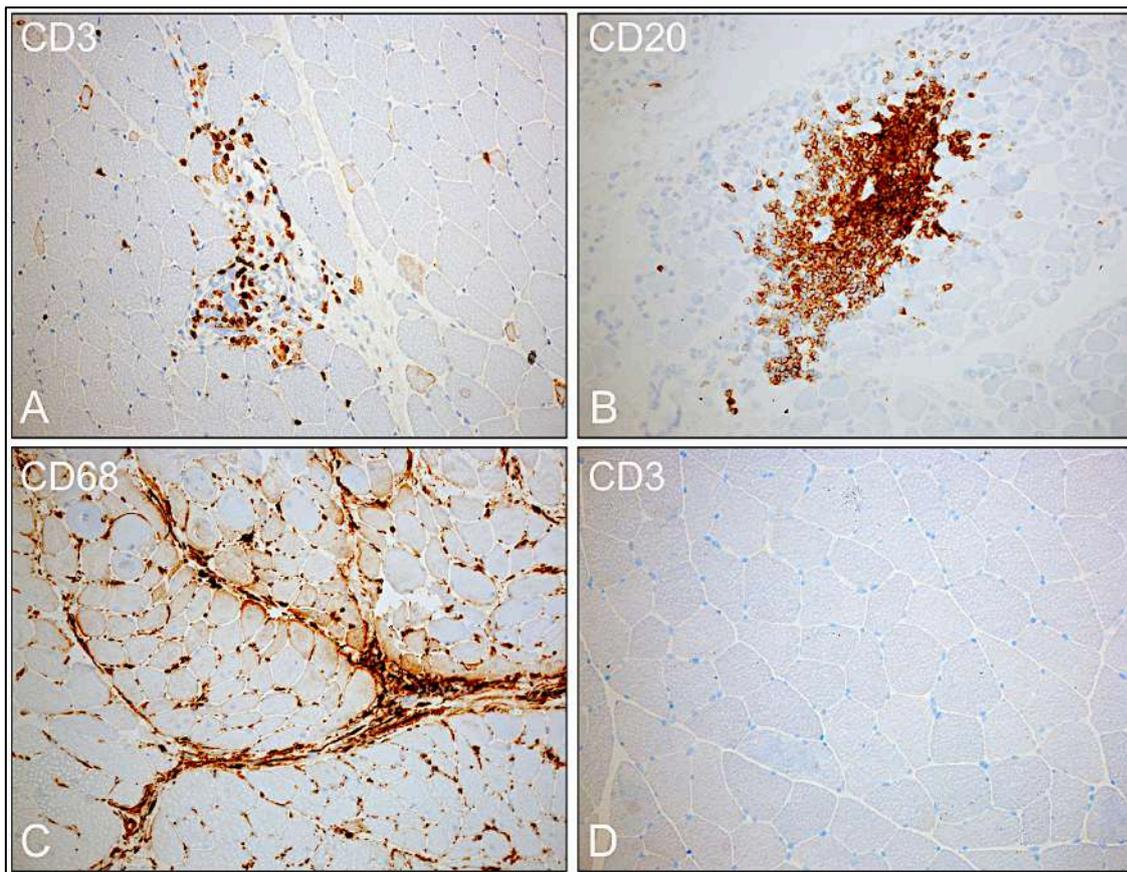


Abb. 20: Darstellung von inflammatorischen Zellen bei jIIM im Vergleich zur Kontrolle
 Zeichen für Inflammation waren in allen Biopsien der Untersuchungsgruppe zu finden. Dabei handelte es sich v.a. um eine Invasion von T-Zellen (A: P3) und Makrophagen (C: P5). In einigen wenigen Fällen konnte man auch eine Einwanderung von B-Zellen (B; P14) finden. Die Kontrollfälle (D: K4) zeigten keine inflammatorischen Zellen. Eigene Fotografien: Vergrößerung 200x. CD=Cluster of Differentiation, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, K=Kontrolle, P=Patient*in

3.2.3 COX-negative Fasern als distinkte Pathologie bei jDM

Interessanterweise waren nur in Biopsien mit jDM COX-negative Fasern zu finden. Die Ausprägung variierte mit einem Score von 0 bis 3 bei allen Biopsien mit jDM. Weder bei Fällen mit ASyS noch bei OM waren COX-negative Fasern vorhanden. Auf ultrastruktureller Ebene zeigten die Mitochondrien nur eine milde Pathologie (Score 0.5 bis 1) mit subsarkolemmalen Aggregationen und/oder Änderungen des Durchmessers (Polymorphie) bei wenigen Biopsien von jDM, Anti-PL7-ASyS und OM. Es waren keine Einschlüsse in den Mitochondrien zu finden (Abb. 22, 23, Tab. 14, 17). Die Kontrollfälle zeigten weder COX-negative Fasern noch ultrastrukturelle Pathologien der Mitochondrien.

3.2.4 Hochregulation der perimysialen alkalischen Phosphatase (ALP) war spezifisch für Anti-Jo1-ASyS

In beiden Fällen mit Anti-Jo1-positiven ASyS zeigten sich starke perifaszikuläre Ablagerungen. Jedoch zeigten weder die Anti-PL7-ASyS, andere IIM noch die Proband*innen der Kontrollgruppe eine solche perimysiale Hochregulation (Abb. 21, 23, Tab. 14).

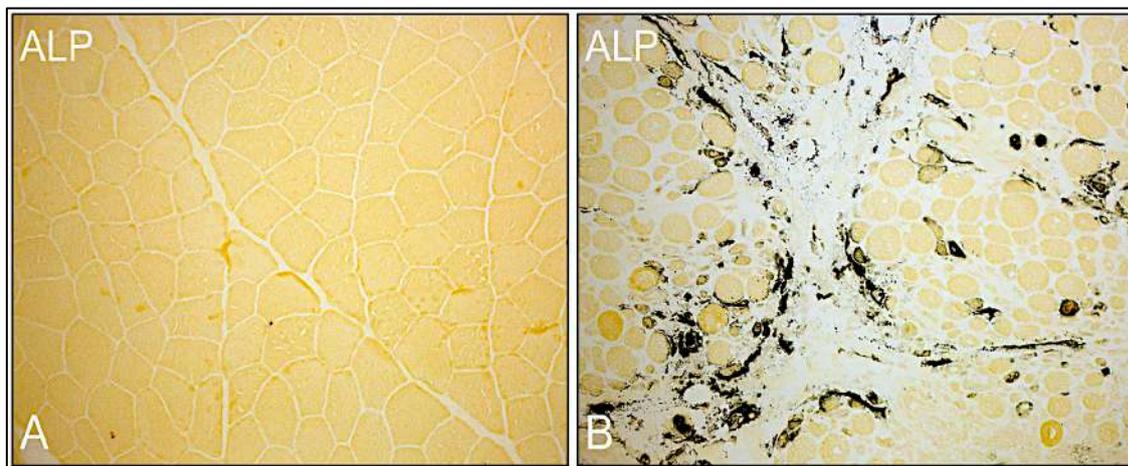


Abb. 21: Perimysiale Hochregulation von ALP in Biopsien von Patient*innen mit Anti-Jo1-ASyS A: keine Expression von ALP bei Kontrollen (K4) B: Perimysiale Hochregulation von ALP bei Anti-Jo1-ASyS (P14). Eigene Fotografien: Vergrößerung 200x. ALP=Alkalische Phosphatase, ASyS=Antisynthetasesyndrom, K=Kontrolle, P=Patient*in

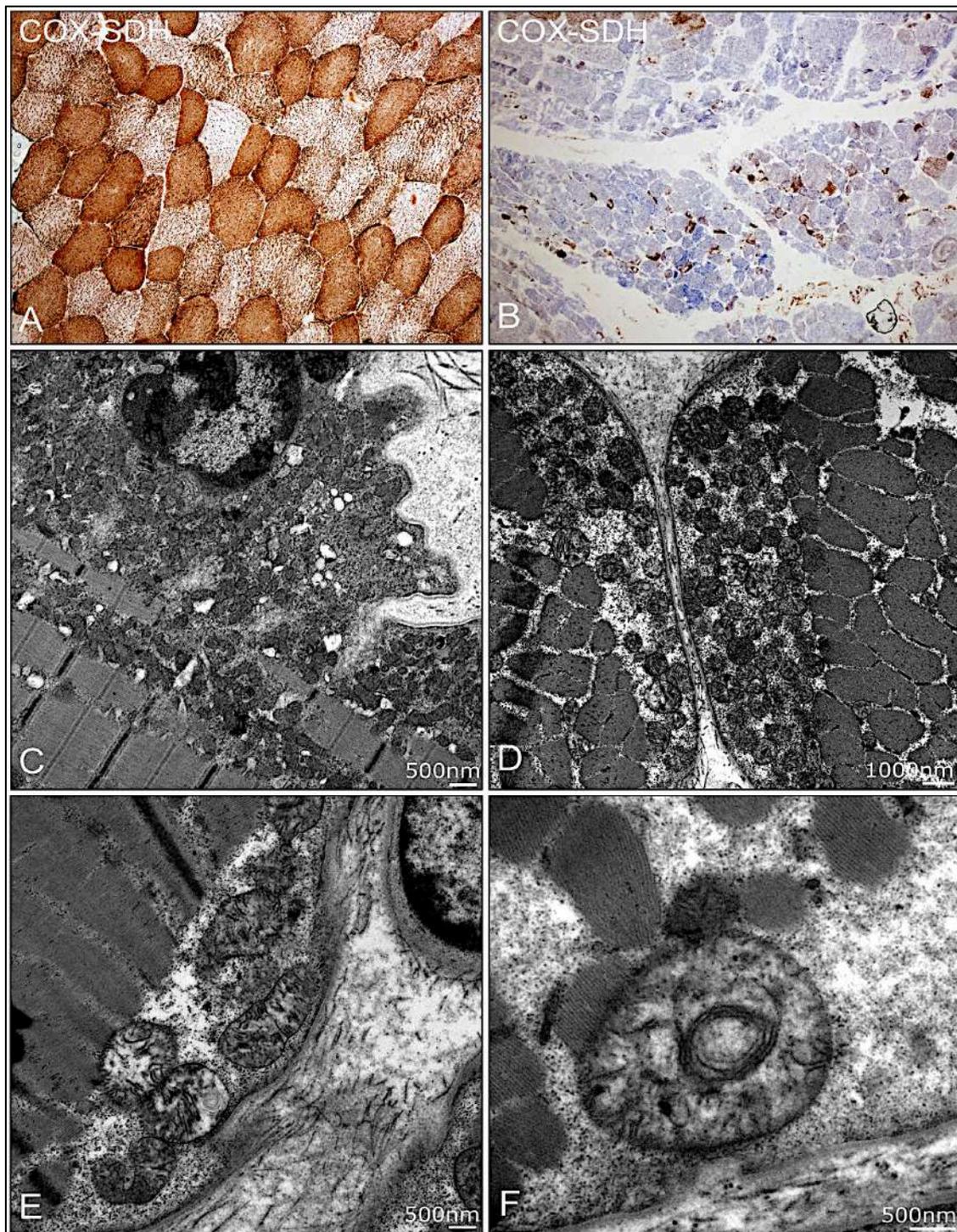


Abb. 22: Lichtmikroskopische und ultrastrukturelle Darstellung der mitochondrialen Pathologie bei jIIM COX-negative Fasern bei jDM (B, P4) im Vergleich zu Kontrolle (A, K4). 200x Vergrößerung. Ultrastrukturell subsarkolemmale Glykogenanlagerungen und Auffaltung des Sarkolemm (C, P12; 12.000x), subsarkolemmale Aggregate (D, P9, 7.000x), polymorphe Mitochondrien mit gestörter Cristae-Struktur (E, P9, 12.000x), einzelne Mitochondrien zeigen eine Auflösung der Cristae Strukturen (F, P9, 20.000x). Eigene Fotografien. COX=Cytochrom-C-Oxidase jDM=Juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, K=Kontrolle, P=Patient*in

Tab. 14: Morphologische Untersuchungen von jIIM anhand von Standard- und Enzymfärbungen

	Diagnose	VAS-Score	Hämalaun-Eosin						COX-SDH	Alkalische Phosphatase
			Perifaszikuläre Atrophie	Punched-out-vacuoles	Nekrose	Regeneration	Ödem	Inflammation	COX-negative Fasern	Hochregulation
P1	jDM	4	1	0	1	2	1	1	2	0
P2	jDM	6	3	1	0	3	1	1	3	0
P5	jDM	6	1	3	1	1	3	2	3	0
P10	jDM	4	0.5	0	1	1	1	0.5	0	0
P11	jDM	1	0	0	0	0	0	0.5	0	0
P12	jDM	8	3	1	2	3	2	2	3	0
P15	jDM	2	0	0	1	0.5	1	0.5	0	0
P4	jDM (NXP2)	9	3	3	1	3	2	1	3	0
P13	jDM (NXP2)	1	0	0	0	0	0	0.5	0	0
P8	ASyS (Jo1)	4	1	0	2	1	1	1	0	1
P14	ASyS (Jo1)	9	3	3	3	3	3	2	0	2
P6	ASyS (PL7)	2	0	0	1	0	0	1	0	0
P9	ASyS (PL7)	2	0	0	1	1	0	0	0	0
P3	OM (SLE)	4	1	0	2	2	0	1	0	0
P7	OM (SLE)	6	0	0	2	2	1	2	0	0

*Erklärung: Für die Bewertung der Färbungen wurde eine Fünf-Punkte-Skala verwendet, um die einzelnen Pathologien der verschiedenen Färbungen zu beurteilen. Der VAS-Score (Visuelle Analogskala) verwendet eine Skala von 0 (als niedrigstes bzw. keine Pathologie) bis 10 (schwerste Pathologie). ASyS=Antisynthetase-Syndrom, COX=Cytochrom-C-Oxidase, jDM=juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, OM=Overlapmyositis, P=Patient*in, POV=Punched-Out-Vacuoles, SDH=Succinatdehydrogenase, SLE=systemischer Lupus erythematoses*

Tab. 15: Morphologische Untersuchungen der Kontrollgruppe anhand von Standard- und Enzymfärbungen

	VAS-Score	Hämalaun-Eosin						COX-SDH	Alkalische Phosphatase
		Perifaszikuläre Atrophie	Punched-out-vacuoles	Nekrose	Regeneration	Ödem	Inflammation	COX-negative Fasern	Hochregulation
K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K7	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Erklärung: Die Kontrollfälle entsprachen morphologisch einem Normalbefund ohne Pathologie. Für die Bewertung der Färbungen wurde eine Fünf-Punkte-Skala verwendet, um die einzelnen Pathologien der verschiedenen Färbungen zu beurteilen. Der VAS-Score (Visuelle Analogskala) verwendet eine Skala von 0 (als niedrigstes bzw. keine Pathologie) bis 10 (schwerste Pathologie). COX=Cytochromoxidase, K=Kontrolle, SDH=Succinatdehydrogenase

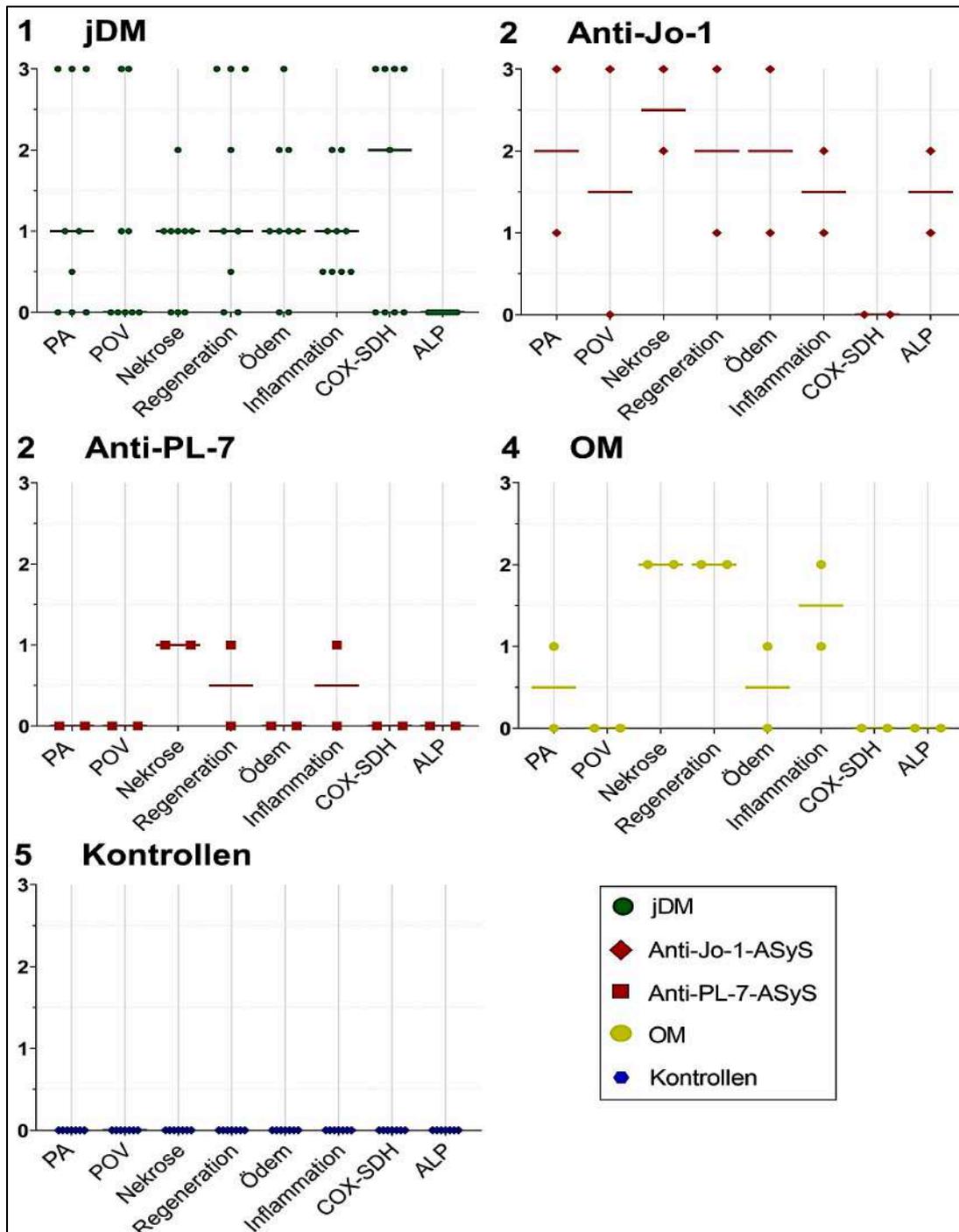


Abb. 23: Scatter-Plots zur Bewertung der Standard- und Enzymfärbungen der jIIM-Subgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe PA und POV waren v.a. bei der jDM und Anti-Jo1-ASyS zu finden. COX-negative Fasern gab es nur in Biopsien mit jDM. Perimysiale Ablagerungen in der ALP-Färbung zeigte sich nur bei Fällen mit Anti-Jo1-ASyS. Neben den individuellen Biopsien (Punkte, siehe Tab. 14, 15) wurde die mediane Verteilung bestimmt (dicker Querstrich). Eigene Abbildung erstellt mithilfe GraphPad Prism. ALP=Alkalische Phosphatase, ASyS=Antisynthetasesyndrom, COX=Cytochromoxidase, jDM=Juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, OM=Overlapmyositis, PA=perifaszikuläre Atrophie, POV=Punched-Out-Vacuoles, SDH=Succinatdehydrogenase

3.2.5 Muskelfaserdestruktion und Regeneration zeigt sich in allen Subtypen von jIIM mit einer stärkeren pathologischen Ausprägung in jDM und Anti-Jo-1-ASyS

Muskelbiopsien von Patient*innen mit jDM und ein Fall mit Anti-Jo1-ASyS (P14) zeigten eine ausgeprägte Störung der myofibrillären Architektur histologisch und in der immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen Myotilin.

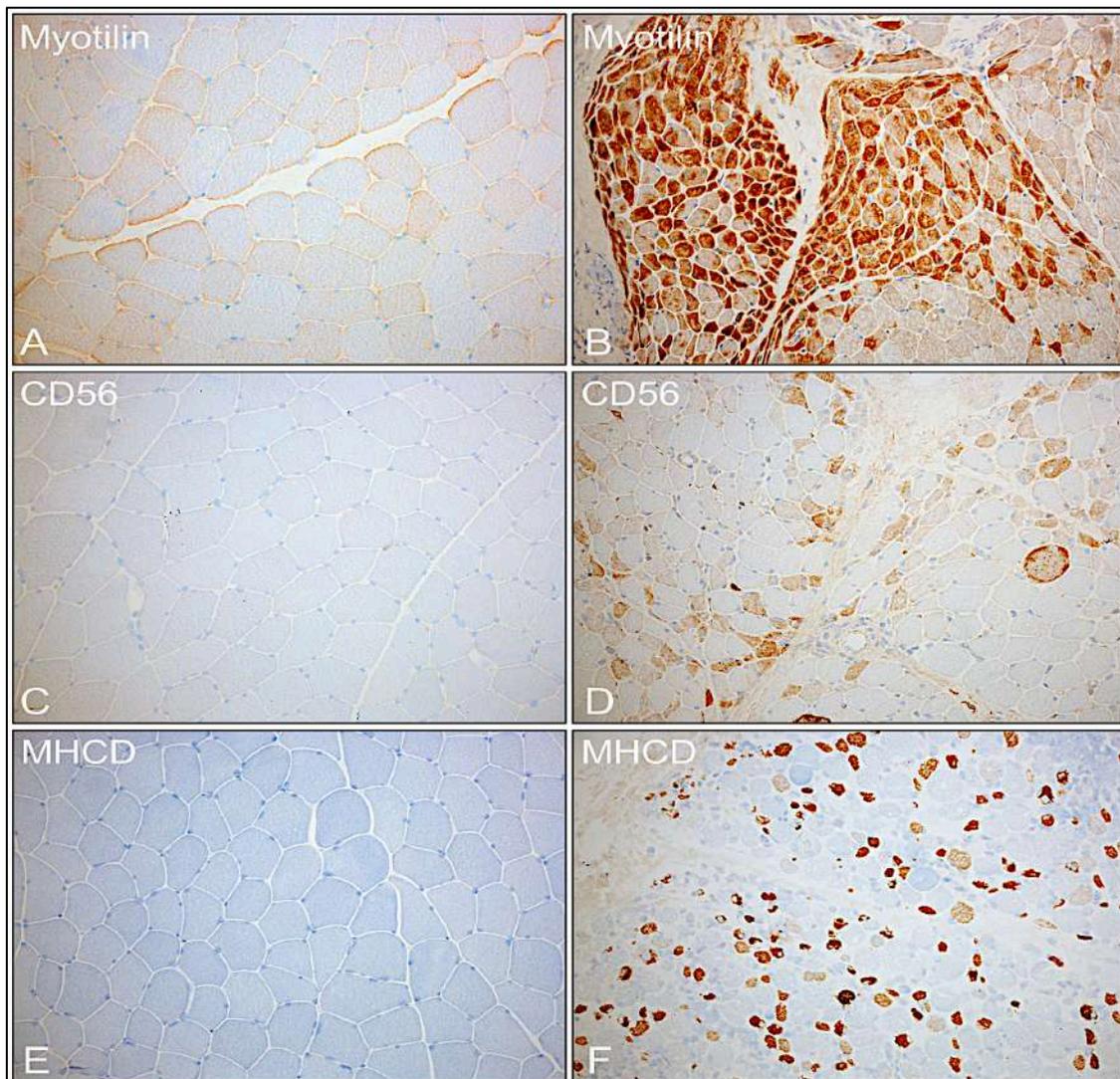


Abb. 24: Muskelfaserdestruktion und Regeneration bei jIIM (P4: B+D, P14: F) im Vergleich zur Kontrolle (K4: A, C, E) IHC-Färbungen mit AK gegen Myotilin (A+B) sind hilfreich zur Beurteilung von myofibrillären Strukturstörungen. Bei den jIIM zeigten vor allem jDM (B) und Anti-Jo1-ASyS eine Störung der myofibrillären Architektur. Mit CD56 (C+D) und MHCD (E+F) konnten zahlreiche Muskelfaserregenerate bei allen jIIM-Subgruppen nachgewiesen werden. Eigene Fotografien: Vergrößerung 200x. AK=Antikörper, ASyS=Antisynthetasesyndrom, CD=Cluster of Differentiation, IHC=Immunhistochemie, jDM=Juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, K=Kontrolle, MHCD=developmental myosin heavy chain, P=Patient*in

Eine myofibrilläre Desintegration ließ sich ebenfalls auf ultrastruktureller Ebene darstellen (Abb. 25, Tab. 17). Es zeigten sich Störungen der sarkomeren Struktur, Z-Band-Alterationen und Glykogeneinlagerungen, besonders in den jDM-Fällen, dem Fall mit Anti-Jo1-ASyS (P14) und dazu einem Fall mit OM (P7). Eine Hochregulation von CD56 und MHCD, die hinweisend auf eine Regeneration der Muskelfasern sind, präsentierten sich in allen IIM Subtypen (Abb. 24, 30, Tab. 16).

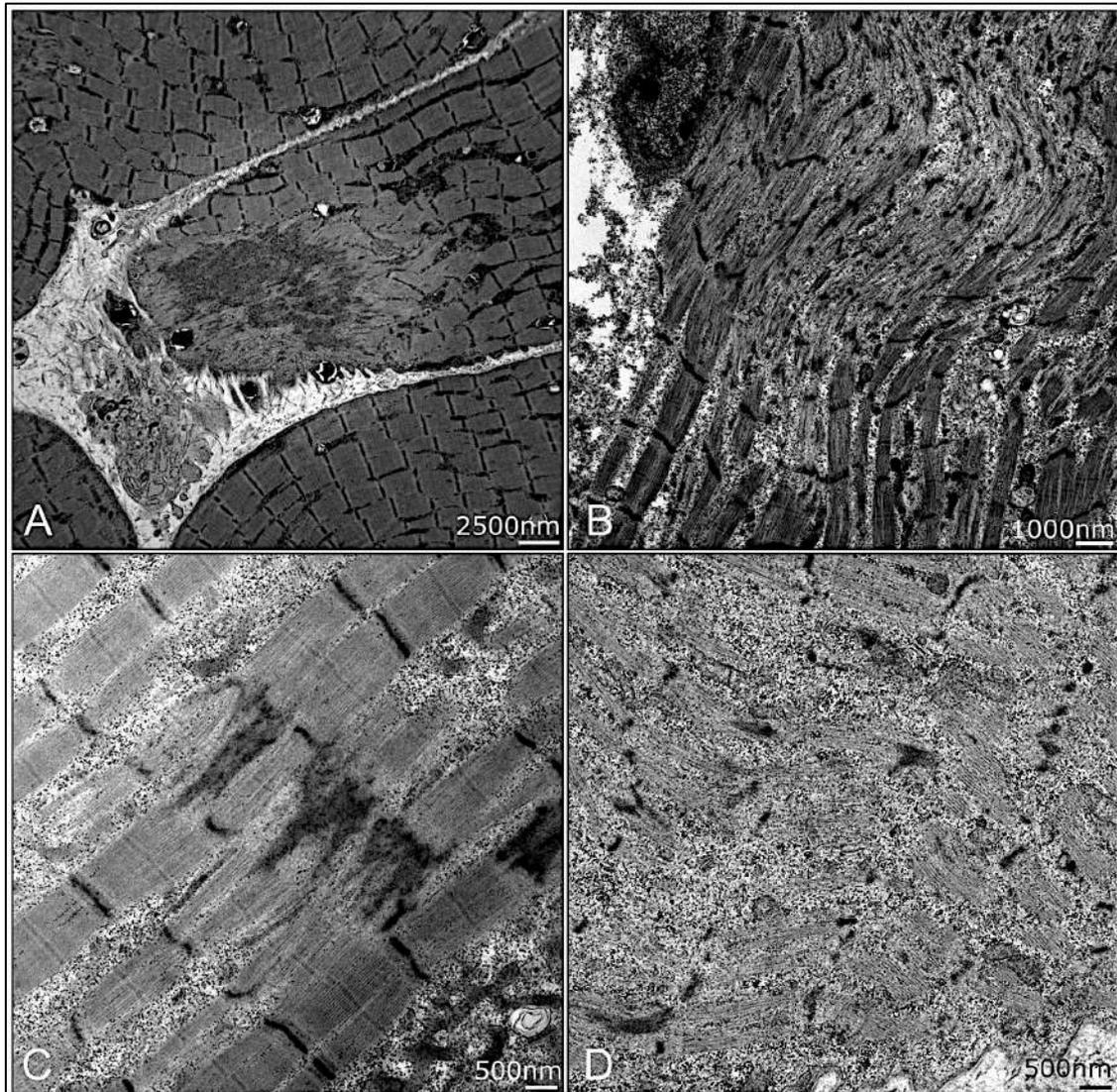


Abb. 25: Ultrastrukturelle Strukturstörungen *V.a. Biopsien mit jDM oder Anti-Jo1-ASyS zeigten eine myofibrilläre Desintegration, u.a. war die sarkomere Struktur aufgelöst (Bild B: P4; 7.000x und D: P7; 12.000x) und es kam zu Z-Band-Alterationen mit sogenannten Z-Band-Streaming (Bild A: P10; 3.000x und C: P15; 12.000-fach). Zudem fanden sich auch verstärkte Glykogeneinlagerungen (C+D). Eigene Fotografien. ASyS=Antisynthetasesyndrom, jDM= Juvenile Dermatomyositis, P=Patient*in*

3.2.6 Sarkolemmale Expression von Komplementablagerungen (c5b-9), MHC I und MHC II

Eine Hochregulation von MHC I auf dem Sarkolemm zeigte sich überwiegend in jIIM (14/15). Zusätzlich zeigte die Mehrheit der Biopsien eine erhöhte sarkolemmale Expression von MHC II, vor allem in den Fällen mit OM (2/2). Insgesamt zeigte sich bei

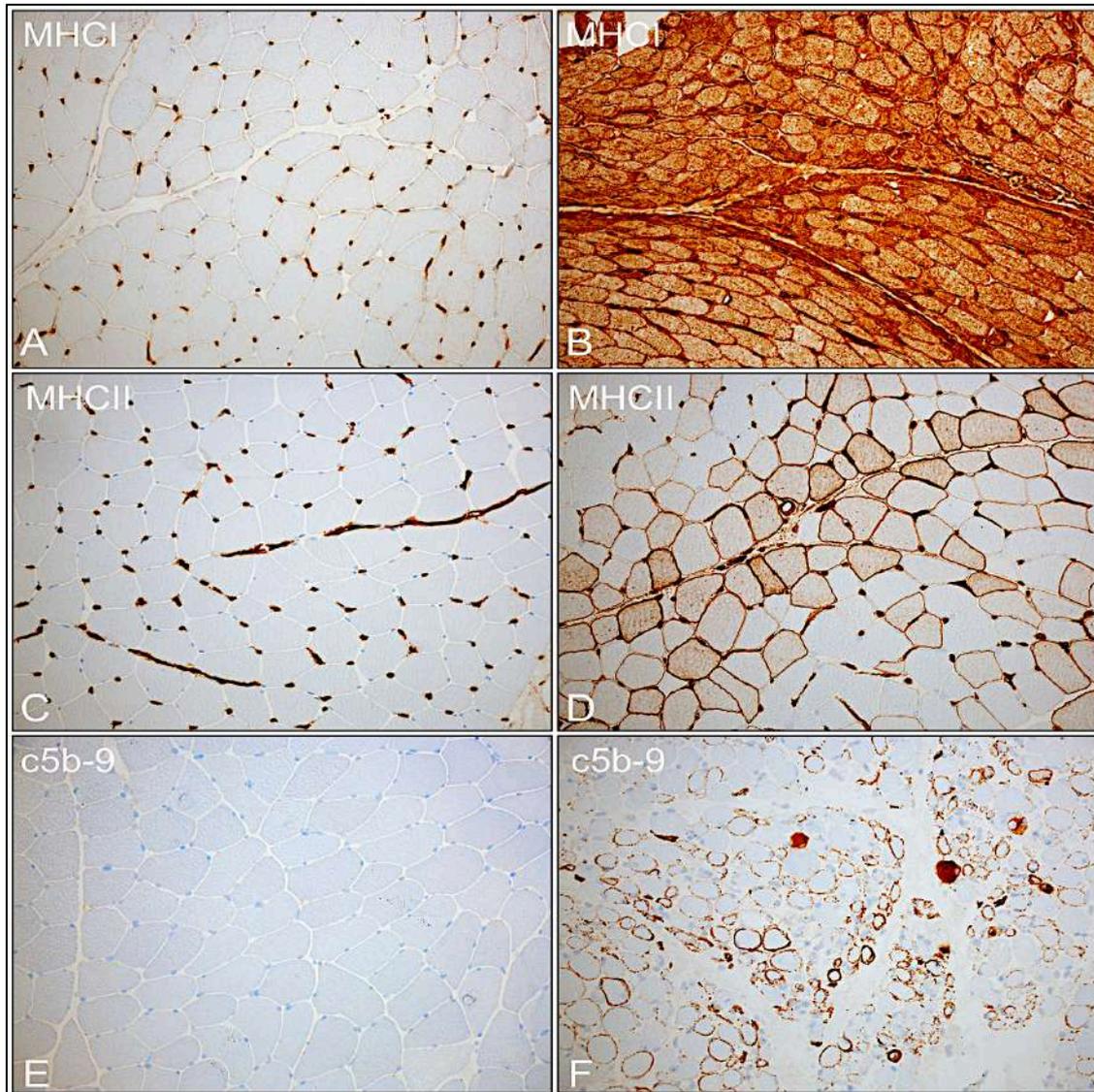


Abb. 26: Sarkolemmale Expression von MHC I, MHC II und Komplement (c5b-9) bei jIIM im Vergleich zu Kontrolle (K4: A, C, E) Bei jIIM zeigte sich eine erhöhte MHC I Expression auf dem Muskelfasersarkolemm (B; P4). Die Mehrheit der jIIM, vor allem OM (D; P3), zeigten eine Hochregulation von MHC II (C+D). Komplementablagerungen (c5b-9, E+F) waren sarkolemmal und auf den endomysialen Kapillaren zu finden. Am stärksten bei Anti-Jo1-ASyS (F; P14). Eigene Fotografien: Vergrößerung 200x. ASyS=Antisynthetasesyndrom, jDM= Juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, K=Kontrolle, MHC=Major Histocompatibility Complex, OM=Overlapmyositis, P=Patient*in

den jIIM-Fällen mit jDM und ASyS eine geringere sarkolemmale Expression von MHC II als MHC I. Komplementablagerungen auf dem Sarkolemm präsentierten nur wenige Fälle (3/9 jDM, 2/4 ASyS, 1/2 OM), wobei die Biopsien mit Anti-Jo1-ASyS die stärkste Expression zeigten. In den Kontrollbiopsien zeigte sich keine erhöhte Expression für MHC I, MHC II und c5b-9 (Abb. 26, 30, Tab. 16, 19).

3.2.7 Muskelbiopsien mit höherem VAS-Score zeigen eine erhöhte Autophagie

Eine Expression der Autophagiemarker p62 und LC3 Ausprägungen zeigten sich in 5/15 der Biopsien (Score: 0.5-1). Biopsien, die einen höheren VAS-Score aufwiesen (P12-score: 8, P4-score: 9, P14-score: 9), zeigten eine verstärkte Expression von LC3 (score:1). Diese Fälle zeigten auch eine erhöhte Muskelfaserregeneration. Die Kontrollen zeigten keine Anzeichen von autophagischen Prozessen in den immunhistochemischen Färbungen. (Abb. 27, 30, Tab. 16, 19)

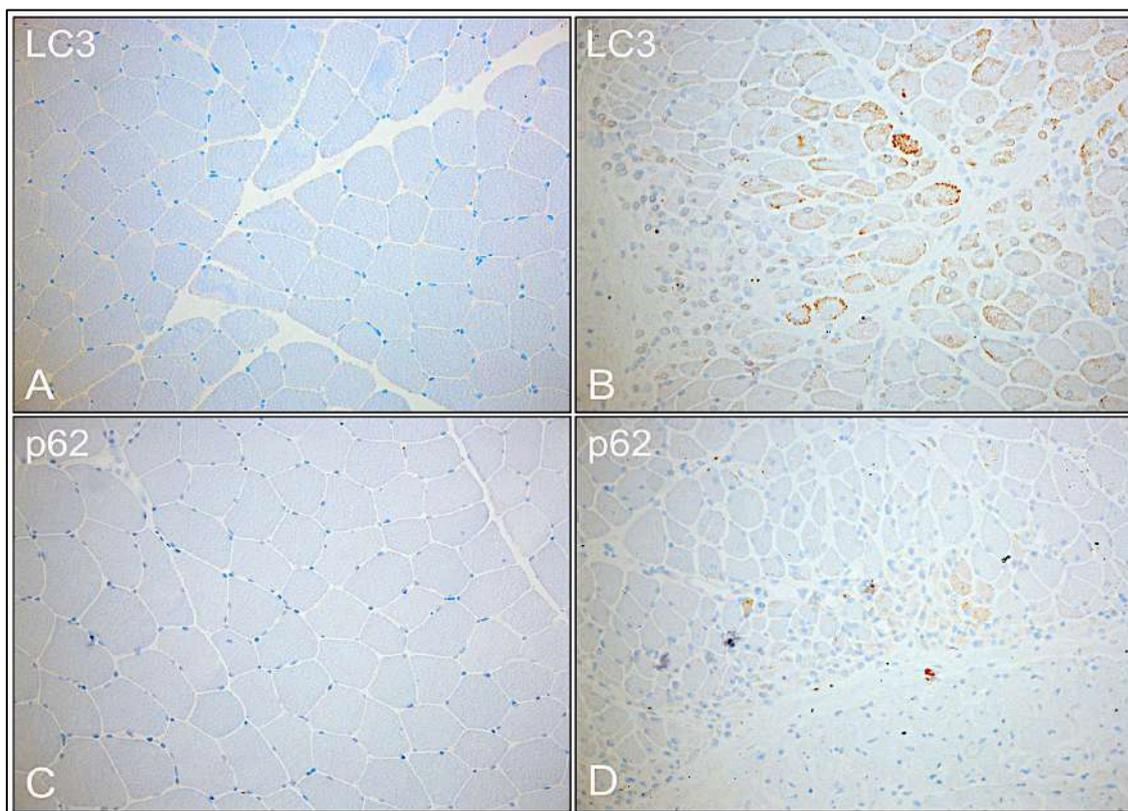


Abb. 27: Expression autophagischer Marker p62 und LC3 bei jIIM im Vergleich zu einer Kontrolle Erhöhte Autophagie einer Patientin (P12, B+D) mit jDM verglichen mit einem morphologisch unauffälligen Normalbefund (K4, A+C). Nur wenige Biopsien exprimierten autophagische Marker wie LC3 und p62. Eigene Fotografien: Vergrößerung 200x. jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, jDM=juvenile Dermatomyositis, K=Kontrolle, LC3= Microtubule-associated protein 1 light chain 3, P=Patient*in

3.2.8 Vaskuläre Pathologie, Hochregulation von proangiogenen VEGF als Hypoxiemarker und Muskelfaserregeneration bei jIIM

In unserer Kohorte wiesen 7/9 jDM und 2/2 Anti-Jo1-ASyS Komplementablagerungen (c5b-9) auf den endomysialen Gefäßen auf.

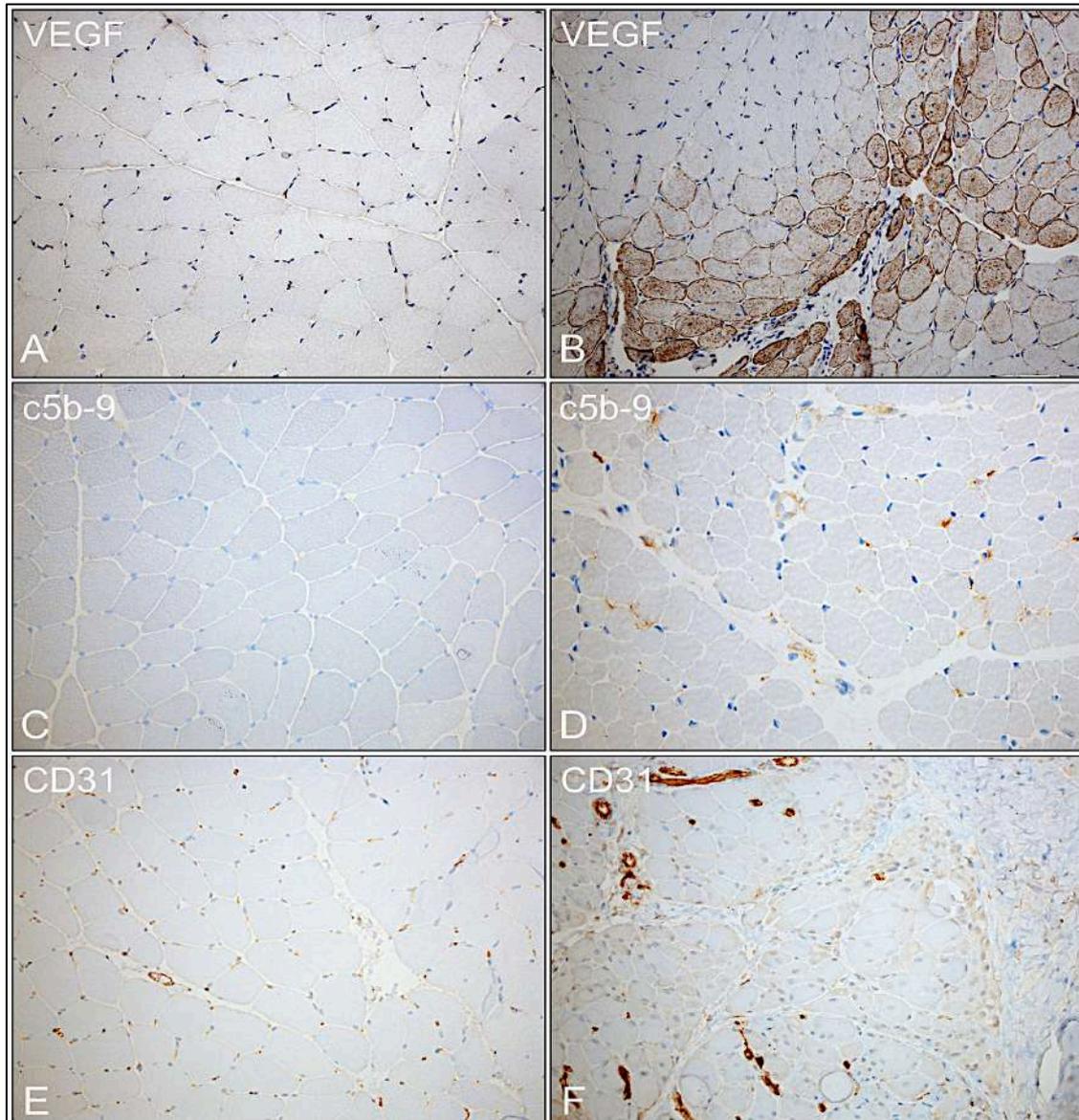


Abb. 28: Vaskulopathie und Hypoxie bei jIIM im Vergleich zu einer Kontrolle Bei den jIIM Fällen (B, D, F) zeigten v.a. jDM und Anti-Jo1-ASyS kapilläre Komplementablagerungen auf den endomysialen Gefäßen (c5b-9; C: K4 und D: P10). Mit CD31 (E: K4 und F: P12) zeigte sich eine deutliche Reduktion der Kapillaren. Zusätzlich zeigten einige Biopsien auch eine starke Hochregulation von VEGF als Zeichen der fokalen Hypoxie (A: K4 und B: P5). Eigene Fotografien: Vergrößerung 200x. ASyS=Antisynthetasesyndrom, CD=Cluster of Differentiation, jDM= juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, K=Kontrolle, P=Patient*in, VEGF=Vascular Endothelial Factor

In der ultrastrukturellen Untersuchung konnten bei jDM (7/8) und Anti-Jo1-ASyS (1/1) tubuloretikuläre Einschlüsse in den Endothelzellen der endomysialen Gefäße entdeckt werden. In der IHC mit AK gegen CD31 zeigte sich eine deutliche Reduktion der endomysialen Gefäße in Biopsien von jDM und ASyS. Eine Hochregulation des proangiogenen Faktors VEGF zeigte sich in allen jIIM-Subtypen mit Ausnahme von Anti-PL7-ASyS. Dabei zeigten jDM und Anti-Jo1-ASyS eine stärkere Expression von VEGF, die zusätzlich mit einer Aktivierung der Muskelfaserregeneration einherging (Myotilin, MHCD und CD56; Abb. 24). Interessanterweise zeigten sich eine Rarefizierung von CD31-positiven Kapillaren (2/2) und eine Hochregulation von VEGF (1/2) auch bei den Fällen mit OM. Diese Biopsien zeigten jedoch keinerlei kapilläre Komplementablagerungen. (Abb. 28, 30, Tab. 16)

3.2.9 Eine Überexpression des Interferon-1-induzierenden (IFN1) Ersatzmarkers Myxovirus resistance protein A (MxA) geht mit endothelialen Einschlüssen bei jDM und Anti-Jo1-ASyS einher

Bei 8/9 Patient*innen mit jDM zeigte sich eine perifaszikulär betonte Hochregulation von MxA am Muskelfasersarkolemm. Eine stärkere Ausprägung der MxA-Expression ging einher mit dem Auftreten von tubuloretikulären Einschlüssen in Endothelzellen im TEM. Zusätzlich zeigten die zwei Fälle mit Anti-Jo1-ASyS sowohl eine sarkolemmale Hochregulation von MxA als auch ultrastrukturelle endotheliale Einschlüsse vergleichbar mit Fällen von jDM. Bis auf ein paar vereinzelte Muskelfasern mit schwacher MxA-Expression bei P6 (Anti-PL7-ASyS) und P3 (OM), zeigten weder die Fälle mit Anti-PL7-ASyS (n=2), OM (n=2) noch die Kontrollen (n=7) eine starke Ausprägung von MxA oder endotheliale Einschlüsse im TEM (Abb. 29, 30, Tab. 16-19).

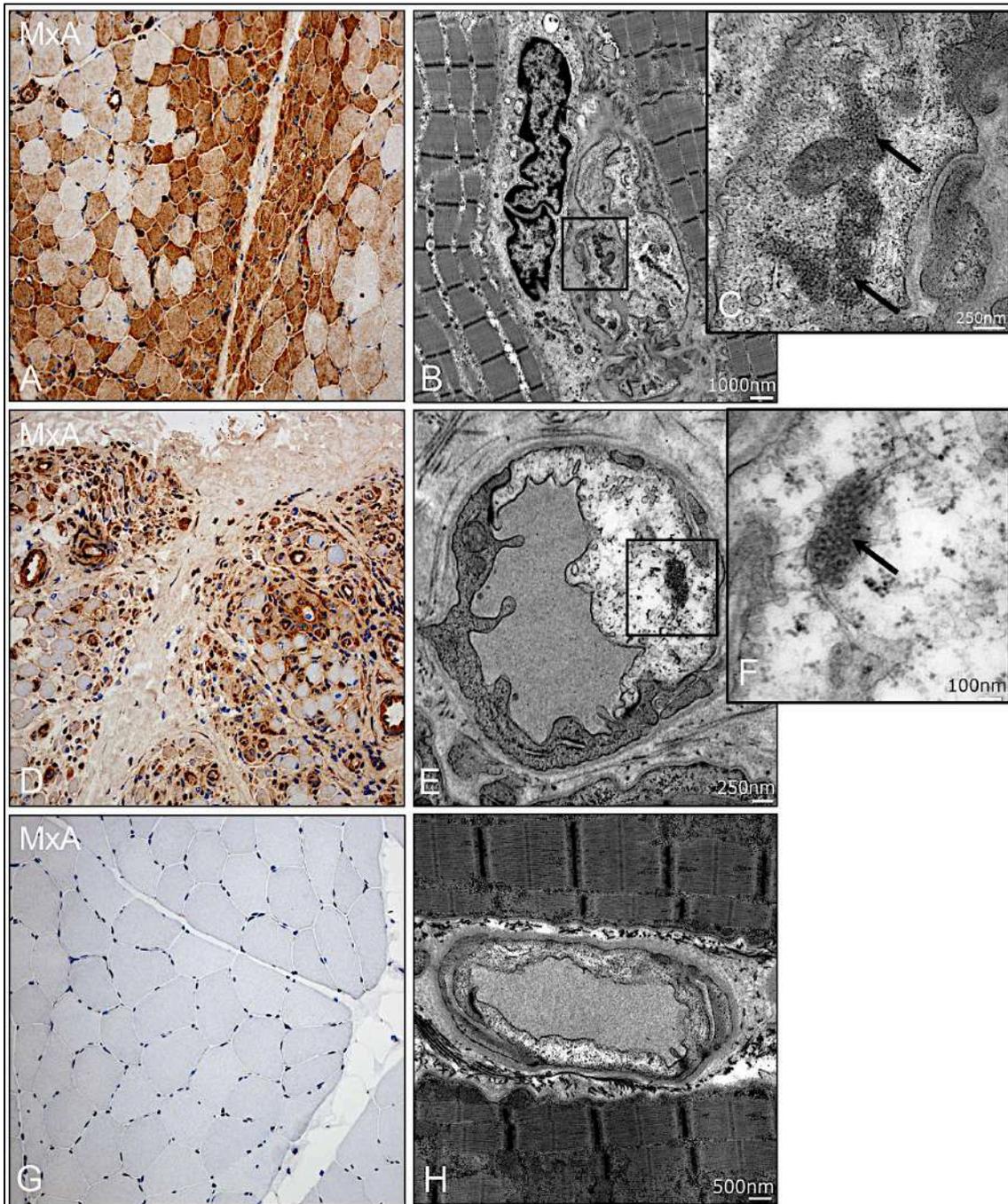


Abb. 29: MxA-Expression und Tubuloretikuläre Einschlüsse (TRE) Nur Fälle mit jDM (A-C: P4) oder Anti-Jo1-ASyS (D-F: P14) zeigten eine starke perimysiale Expression von MxA (200x Vergrößerung) einhergehend mit ultrastrukturellen TRE in den Endothelzellen der endomysialen Gefäße. Weder die Kontrollen (G: K4 und H: K5; 12.000x) noch Biopsien der anderen untersuchten IIM-Subtypen zeigten diese TRE. Zur besseren Darstellung wurden, neben einer Gesamtübersicht der Gefäße, die TRE (C und F) noch in einer höheren Vergrößerung dargestellt. B:4400x, C:30.000x, E:20.000x, F:50.000x. Eigene Fotografien. ASyS=Antisynthetasesyndrom, IIM=idiopathisch immunvermittelte Myopathie, jDM= Juvenile Dermatomyositis, K=Kontrolle, MxA=Myxovirus Resistance Protein 1, OM=Overlapmyositis, P=Patient*in

Tab. 16: Morphologische Untersuchungen der jIIM mit IHC-Färbungen

	Diagnose	Inflammation und Immunaktivierung						Komplementab-lagerungen (c5b-9)		MxA	Regeneration		Sarkomere Disruption	Angiogenese		Autophagie	
		MHC I	MHC II	CD 3	CD 8	CD 20	CD 68	sarkolem mal	kapillär		CD 56	MHCD	Myotilin	CD31 Rarefikation	VEGF	LC3	p62
P1	jDM	2	1	1	1	0	1	2	2	3	2	0	1	1	1	0	0
P2	jDM	2	1	1	1	0	1	1	0	3	1	1	2	2	2	0	0
P5	jDM	3	0.5	2	1	2	3	0	1	3	3	2	3	2	3	0.5	0.5
P10	jDM	3	3	2	1	0	1	0	3	2	0	0	2	2	1	0	0
P11	jDM	2	0	0.5	0	0	1	0	0.5	2	0	0	0	1	0	0	0
P12	jDM	3	2	1	0	0	2	0	0.5	3	2	2	3	3	2	1	0.5
P15	jDM	3	0.5	0.5	0.5	0	1	0	2	3	1	0	2	1	0	0	0
P4	jDM (NXP2)	3	2	2	1	1	2	1	2	3	3	0.5	2	3	0.5	1	0.5
P13	jDM (NXP2)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
P8	ASyS (Jo1)	3	0.5	1	1	0	2	0	3	3	0.5	0.5	0.5	2	0.5	0	0
P14	ASyS (Jo1)	3	2	2	1	3	3	3	2	3	3	3	3	2	2	1	0
P6	ASyS (PL7)	2	0.5	1	1	0	2	2	0	0.5	0	1	0	1	0	0	0
P9	ASyS (PL7)	1	1	1	0.5	0	1	0	0	0	1	1	0.5	0	0	0	0
P3	OM (SLE)	2	2	2	2	3	3	1	0	0.5	2	2	1	1	1	0.5	1
P7	OM (SLE)	2	2	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0

*Erklärung: Für die Bewertung der immunhistochemischen Färbungen wurde eine Fünf-Punkte-Skala verwendet. ASyS=Antisynthetasesyndrom, CD=cluster of differentiation, jDM=juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, LC3=microtubule-associated protein 1 light chain 3, MHC=major histocompatibility complex, MHCD=developmental myosin heavy chain, MxA=Myxovirus resistance protein A, OM=Overlapmyositis, P=Patient*in, SLE=Systemischer Lupus erythematoses, VEGF=vascular endothelial growth factor*

Tab. 17: Ultrastrukturelle Analyse der jIIM

	Diagnose	Myofibrilläre Struktur			Mitochondrien			Endomysiale Kapillaren
		Sarkomere Struktur	Z-Band-Alteration	Glykogeneinlagerungen	Aggregation	Polymorphie	Einschlüsse	(Tubuloretikuläre Einschlüsse/ Anzahl betrachteter Gefäße)
P1	jDM	1	1	2	1	1	0	2 (3/10)
P2	jDM	3	3	0	0.5	0	0	2 (4/10)
P5	jDM	Nicht analysiert						
P10	jDM	2	2	2	0	0	0	1 (2/10)
P11	jDM	1	1	3	0	0	0	3 (6/10)
P12	jDM	3	3	0.5	0	0	0	1 (2/10)
P15	jDM	3	3	2	0	0	0	1 (2/10)
P4	jDM (NXP2)	3	3	1	0	0	0	3 (8/10)
P13	jDM (NXP2)	0	0	0	0	0	0	0 (0/10)
P8	ASyS (Jo1)	Nicht analysiert						
P14	ASyS (Jo1)	2	2	2	0	0	0	3 (3/5)
P6	ASyS (PL7)	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0 (0/10)
P9	ASyS (PL7)	0.5	0.5	0.5	1	1	0	0 (0/10)
P3	OM (SLE)	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0 (0/10)
P7	OM (SLE)	2	2	0.5	1	0	0	0 (0/10)

*Erklärung: Die ultrastrukturelle Untersuchung wurde nicht bei allen Patient*innen durchgeführt. Für die Bewertung der ultrastrukturellen Pathologie wurde eine Fünf-Punkte-Skala verwendet. P14 zeigte eine ausgeprägte Rarefizierung an Gefäßen, daher konnten nur 5 Gefäße beurteilt werden. Patient*innen mit der Diagnose einer jDM oder eines Anti-Jo1-ASyS zeigten im TEM eine Störung in der myofibrillären Struktur und Einschlüsse der endomysialen Gefäße. Die Patient*innen mit einem Anti-PL7-ASyS zeigten eine geringere Pathologie. Sowohl die Fälle mit Anti-PL7-ASyS als auch OM, zeigten keine Einschlüsse an den endomysialen Gefäßen. ASyS=Antisynthetasesyndrom, jDM=juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, OM=Overalapyositis, P=Patient*in, SLE=Systemischer Lupus erythematodes*

Tab. 18: Ultrastrukturelle Analyse der Kontrollgruppe

	Myofibrilläre Struktur			Mitochondrien			Endomysiale Kapillaren
	Sarkomere Struktur	Z-Band-Alteration	Glykogeneinlagerungen	Aggregation	Polymorphie	Einschlüsse	(Tubuloretikuläre Einschlüsse/ Anzahl betrachteter Gefäße)
K1	0	0	0	0	0	0	0 (0/10)
K2	0	0	0	0	0	0	0 (0/10)
K3	0	0	0	0	0	0	0 (0/10)
K4	0	0	0	0	0	0	0 (0/10)
K5	0	0	0	0	0	0	0 (0/10)
K6	0	0	0	0	0	0	0 (0/10)
K7	0	0	0	0	0	0	0 (0/10)

Erklärung: Die Biopsien in der Kontrollgruppe zeigten in der TEM-Analyse ultrastrukturell keine Pathologien, entsprechend einem Normalbefund. Zur Bewertung wurde eine Fünf-Punkte-Skala verwendet. K=Kontrolle, TEM=Transmissionselektronenmikroskopie

Tab. 19: Morphologische Untersuchungen bei der Kontrollgruppe mit IHC-Färbungen

	Inflammation und Immunaktivierung						Komplement-ablagerungen (c5b-9)		MxA	Regeneration		Sarkomere Disruption	Angiogenese		Autophagie	
	MHC I	MHC II	CD 3	CD 8	CD 20	CD 68	sarko-lemmal	kapillär		CD 56	MHCD	Myotilin	CD31 Rarefikation	VEGF	LC3	p62
K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Erklärung: Alle Kontrollbiopsien zeigten einen unauffälligen Normalbefund. Für die Bewertung der immunhistochemischen Färbungen wurde eine Fünf-Punkte-Skala verwendet. CD=cluster of differentiation, IHC=Immunhistochemie, K=Kontrolle, LC3=microtubule-associated protein 1 light chain 3, MHC=major histocompatibility complex, MHCD=developmental myosin heavy chain, MxA=Myxovirus resistance protein A, VEGF=vascular endothelial growth factor

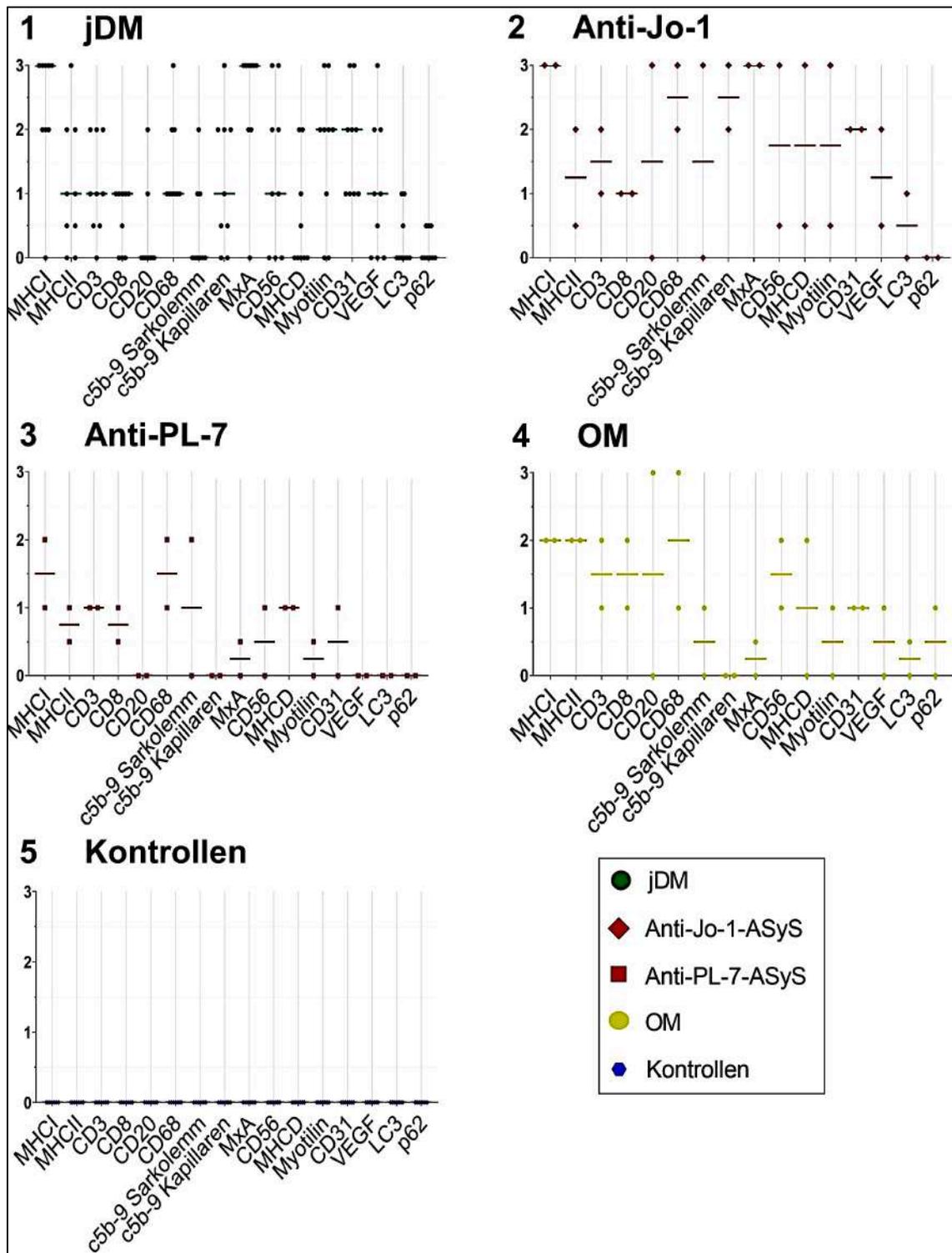


Abb. 30: Darstellung der Immunhistochemischen Färbungen bei jIIM-Subgruppen und Kontrollen Überblick der Bewertung der IHC-Färbungen in den einzelnen IIM-Gruppen und der Kontrollfälle. Die Punkte stehen für die einzelnen untersuchten Patient*innen (Tab.16, 19). Aus den einzelnen Werten wurde der Median gebildet (dicker Querstrich). Die Bewertung wurde von zwei verblindeten Neuropatholog*innen durchgeführt. Eigene Abbildung erstellt mithilfe GraphPad Prism. ASyS=Antisynthetasesyndrom, jDM= Juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, OM=Overlapmyositis

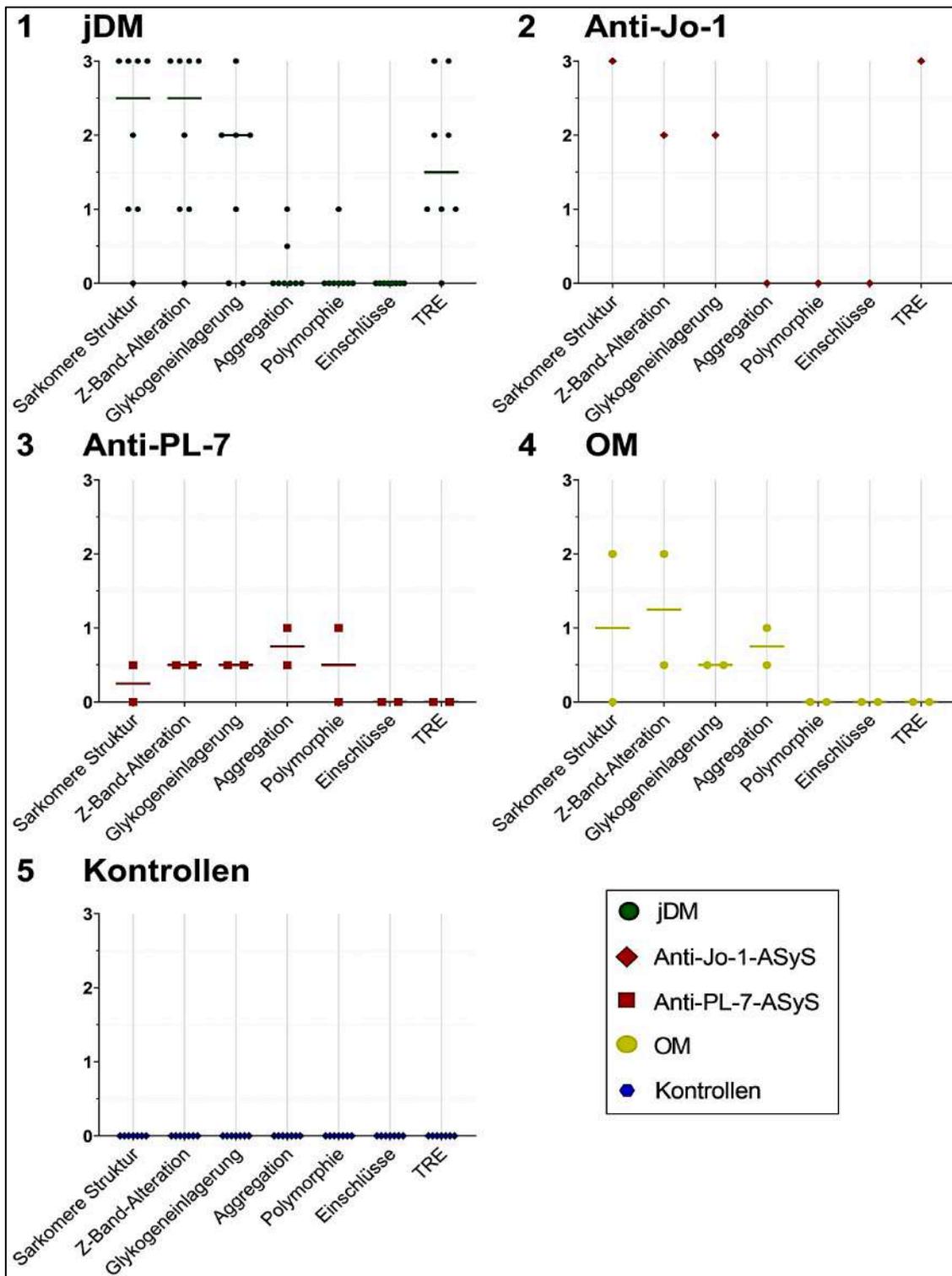


Abb. 31: Ultrastrukturelle Pathologien der jIIM und Kontrollgruppe Die Punkte stehen für die einzelnen Fälle (Tab. 17, 18), der Querstrich bildet die mediane Verteilung ab. TRE zeigten nur Fälle mit jDM und ein Fall mit Anti-Jo1-ASyS (P14). Es standen nicht von allen Biopsien Material für die TEM-Untersuchung zur Verfügung (P5 und P8 fehlen). Eigene Abbildung erstellt mithilfe GraphPad Prism. ASyS=Antisynthetasesyndrom, jDM=Juvenile Dermatomyositis, jIIM=juvenile idiopathisch immunvermittelte Myopathie, OM=Overlapmyositis, P=Patient*in, TEM= Transmissionselektronenmikroskopie, TRE=tubuloretikuläre Einschlüsse

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

- 15 Kinder und Jugendliche (mittleres Alter $8,7 \pm 4,4$ Jahre, Spannweite 3 – 17 Jahre, 73 % weiblich) wurden im Zeitraum von 2002 bis 2018 in der Neuropädiatrie des Universitätsklinikums Gießen mit dem klinischen Bild einer IIM vorstellig
- vorrangige Präsentation mit Schmerzen (73%), proximale Muskelschwäche (93%), Hautreaktionen (100%), laborchemisch zeigte sich CK-Erhöhung (93%), ein Drittel präsentierte Traurigkeit (33 %)
 - Unterschiede dann in Antikörper-Untersuchungen und Pathologie
 - erweiterte Diagnostik variierte, allen Patient*innen wurde eine Muskelbiopsie zur exakten Diagnosestellung entnommen
- in der Serumantikörperanalyse: positive ANA (69%); 6/12 der Patient*innen, die eine erweiterte AK-Untersuchung bekommen haben, zeigten positive MSA, 2/12 zeigten MAA, 2 Patient*innen wiesen AK für eine OM auf
- typisch für DM und ASyS Fälle in der HE-Färbung war eine perifaszikuläre Atrophie und das Auftreten von Punched-out-vacuoles
- alle Subtypen von IIM zeigten ein inflammatorisches Geschehen mit dem Auftreten von Entzündungszellen (v.a. T-Lymphozyten CD3, CD8, und Makrophagen CD68), Ödembildung, Nekrose und Regeneration (CD56, MHCD) und einer sarkolemmale Hochregulation von MHCI
- nur vereinzelte Fälle zeigten B-Lymphozyten (CD20) und einer sarkolemmalen MHCII Expression
- COX-negative Fasern zeigten sich nur bei Biopsien mit jDM
- es zeigte sich eine moderate mitochondriale Pathologie im TEM; vereinzelt zeigte sich bei Biopsien der Untersuchungsgruppe eine Aggregation von Mitochondrien und/oder eine Polymorphie, jedoch keine mitochondrialen Einschlüsse
- eine perifaszikuläre ALP Expression zeigte sich nur bei Anti-Jo1-ASyS
- eine sarkomere Strukturstörung (Myotilin und TEM) zeigten vor allem bei DM und Anti-Jo1-ASyS
- eine Rarefizierung der endomysialen Kapillaren (CD31) war in allen Subtypen zu erkennen
- eine erhöhte Expression von VEGF zeigten alle jIIM-Subtypen bis auf Anti-PL7-ASyS, diese Biopsien präsentierten vermehrt Anzeichen für Regeneration (CD56, MHCD)

- autophagische Prozesse (LC3, p62) korrelierten mit der Muskelfaserpathologie und Regeneration, zeigten jedoch keine spezifische Auffälligkeit bei jIIM
- jDM und Anti-Jo1-ASyS zeigten ähnliche Charakteristika wie kapilläre Ablagerungen von Komplement (c5b-9) und eine verstärkte sarkolemmale Expression von MxA mit tubuloretikulären Einschlüssen im TEM
- Fälle mit OM und PL7-ASyS zeigten keine kapillären Komplementablagerungen, nur eine geringe MxA-Expression (Score 0 bis 0.5) und keine TRE im TEM

4 Diskussion

4.1 Diskussion

JIIIM sind eine heterogene Gruppe von seltenen systemischen Autoimmunerkrankungen, die durch eine Muskelschwäche, eine chronische Entzündung des Skelettmuskels und extramuskulären Begleitsymptomen charakterisiert sind (Rider/Nistala, 2016). Trotz einer großen Entwicklung in den letzten Jahren besteht noch kein internationaler Konsens in der Klassifizierung der jIIM, was zu klinischen Unsicherheiten führt (Zoske et al., 2021). Ausführliche klinische und morphologische Untersuchungen an jIIM-Patient*innen könnten hilfreich sein, eine Subtypisierung weiter zu charakterisieren.

Ziel dieser Studie war es, die unterschiedlich vertretenen Subtypen von jIIM mithilfe von unmittelbar zugänglichen und für die diagnostischen Zwecke empfohlenen Färbungen der Muskelbiopsien zu analysieren und zu vergleichen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass morphologische Unterschiede zwischen juvenilen Myositis-Subtypen bestehen. Diese Unterschiede sind mit den aktuellen Hypothesen über die verschiedenen Immunmechanismen und Pathogenesen zu vereinbaren, die bei diesen IIM-Subtypen von Bedeutung sind (Baechler/Bilgic/Reed, 2011; Dalakas, 2015; Hedberg-Oldfors et al., 2022; Rider/Nistala, 2016). Eine spezifische Diagnose ist wichtig, da die verschiedenen Subtypen mit unterschiedlichen Prognosen und Therapieansprechen einhergehen (Dalakas, 2015). Da Behandlungsmöglichkeiten mit zielgerichteten und individualisierten Therapien (sogenannten *targeted therapies*), die auf die spezifische Ätiopathogenese von Erkrankungen zugeschnitten sind, weiter an Bedeutung gewinnen, ist es besonders wichtig, über ein fein abgestimmtes multidimensionales diagnostisches Repertoire zu verfügen, welches die Immunpathogenese der jIIM widerspiegelt (Stenzel et al., 2021).

4.2 Klinische Befunde der IIM im Kindesalter im Vergleich zum Erwachsenenalter

JIIIM gehören mit einer Prävalenz von rund 1,6 bis 4,0 Millionen Personenjahre zu den seltenen Erkrankungen (Barnabe et al., 2012; Bernatsky et al., 2009; Dobloug et al., 2015; Furst et al., 2012; Meyer et al., 2015; Oddis et al., 1990; Svensson et al., 2017; Yu et al., 2013). In der vorliegenden single-zentrischen Studie konnten in einem Zeitraum von 16 Jahren 15 Patienten eingebracht werden. Die Altersverteilung und das Überwiegen von weiblichen Patient*innen entspricht der demografischen Verteilung anderer Studien (Rider/Nistala, 2016). Die Mehrheit der Patient*innen waren dem Subtyp der juvenilen

DM zugehörig (n=9), danach folgten vier Patient*innen mit ASyS und zwei Patient*innen mit OM mit der Grunderkrankung eines SLE. Eine IMNM tritt sehr selten im Kindesalter auf (siehe Tab. 1) (Wu/Lu/Reed, 2020) und konnte in unserer Kohorte nicht mit untersucht werden. Die in dieser Studie eingeschlossenen Patient*innen mit jIIM präsentierten als Leitsymptomatik eine subakute Manifestation einer proximalen Muskelschwäche, eine Erhöhung der CK und Hauterscheinungen. Diese Befunde sind gut vereinbar mit anderen Beschreibungen, dass eine dermale Beteiligung, wie z.B. Gottronsche Papeln, nicht nur bei jDM, sondern auch bei anderen Subtypen der jIIM zu beobachten ist (Betteridge et al., 2019; Gunawardena/Betteridge/McHugh, 2009; Lundberg et al., 2021; Mariampillai et al., 2018; Tanboon et al., 2020). Interessanterweise konnten bei einem Drittel unserer Patient*innen starke Stimmungsschwankungen und Traurigkeit festgestellt werden, was bei den Berichten von erwachsenen Patient*innen mit IIM bisher nicht beschrieben worden ist. Dalakas et al. benannte Stimmungsänderungen, Gereiztheit, Fatigue und einen sozialen Rückzug sogar als Frühsymptome der jDM (Dalakas, 2015). Überlappende klinische Symptome und Phänotypen in den verschiedenen Subentitäten der IIM können eine Herausforderung für die richtige Diagnosestellung und Therapiefindung sein. Distinkte klinische Merkmale der Subtypen müssen erkannt und interdisziplinär evaluiert werden (Allenbach et al., 2017). Kalzinosen, ein typisches Hautsymptom der jDM, treten bei etwa 27% der juvenilen Patient*innen auf und zeigen sich seltener im Erwachsenenalter (Dalakas, 2015; Marhaug et al., 2008; Rider/Nistala, 2016; Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013). Vor allem sehr junge jDM Patient*innen mit NXP2-AK können eine Assoziation zu Kalzinosen aufweisen (Tansley et al., 2014). In unserer Kohorte gab es nur einen Fall von NXP2-assoziierte DM, die Kalzinosen zeigte. Zudem wiesen auch Patient*innen mit einer seronegativen jDM, einem Anti-Jo1-ASyS und einem Anti-PL7-ASyS Kalzinosen auf. Ein Patient mit Anti-Jo1-ASyS zeigte ein Raynaud Phänomen, welches auch in der Literatur als extramuskuläres Symptom v.a. mit einer DM oder einem ASyS assoziiert wird (Tab. 10) (Betteridge et al., 2019; Lundberg et al., 2021). 20 % der Patient*innen in dieser Arbeit zeigten eine pulmonale Beteiligung. Es handelte sich dabei nur um Fälle mit jDM. ILD bei Adulten wie Juvenilen gelten jedoch v.a. bei dem ASyS als häufig (Allenbach et al., 2017; Dalakas, 2015; Gunawardena/Betteridge/McHugh, 2009; Rider/Nistala, 2016; Tanboon et al., 2020). Die Patient*innen in dieser Studie mit ASyS zeigten weder mit Anti-Jo1 noch mit Anti-PL-7-ASyS eine pulmonale Beteiligung, was jedoch auch auf der geringen Gruppengröße von nur vier Patient*innen beruhen könnte.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen adulten und juvenilen IIM ist das erhöhte Risiko von malignen Erkrankungen v.a. bei adulten Patient*innen mit TIF1 γ - oder NXP2-positiver DM, während bei juvenilen Patient*innen bisher kein Zusammenhang zu malignen Geschehen gefunden wurde (Dalakas, 2015; Preuße et al., 2016; Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013). Auch in dieser Studie wies keiner der juvenilen Patient*innen eine maligne Erkrankung auf.

4.3 Die Bedeutung der Myositis-spezifischen Autoantikörper für die Diagnose einer IIM

Die Klassifizierung der IIM ist in den letzten Jahren, u.a. durch die Entdeckung von MSA, deutlich verbessert worden. MSA gelten als krankheitsspezifische AK, die in ca. 50 % der IIM nachzuweisen sind. (Bonroy et al., 2022; Damoiseaux et al., 2022; Lundberg et al., 2021; Yeker et al., 2018) In dieser retrospektiven Studie zeigte sich die Hälfte der auf MSA-untersuchten Patient*innen positiv. Bei adulten sowie jIIM handelt es sich generell um die gleichen AK, jedoch variiert deren Verteilung stark. Am häufigsten finden sich bei jIIM Anti-NXP2, Anti-MDA5 und Anti-TIF1 γ , wohingegen bei adulten Patient*innen am häufigsten AK gegen die Antisynthetasen (30-40 %), wie z.B. Anti-Jo1 (20-30 % der IIM), zu finden sind. (Benveniste/Goebel/Stenzel, 2019; Cerbelli et al., 2018; Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022; Gunawardena/Betteridge/McHugh, 2009; Mescam-Mancini et al., 2015; Rider/Nistala, 2016; Stenzel et al., 2021; Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013) In der vorliegenden Arbeit hatten Patienten mit jDM und Nachweis von NXP2-AK ein ausgeprägtes Krankheitsgefühl mit starker muskulärer Beteiligung (P4), Kalzinosen und Traurigkeit, was die in der Literatur beschriebene Symptomatik von NXP2-positiver jDM bestätigt. Sodass es möglich ist, eine Prognose vom MSA-Status der Patient*innen abzuleiten. (Aouizerate et al., 2018; Gunawardena/Betteridge/McHugh, 2009; Mariampillai et al., 2018; Rider/Nistala, 2016; Stenzel et al., 2021; Tanboon et al., 2020; Tansley et al., 2014; Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013) Jedoch zeigte eine NXP2-positive-Patientin zusätzlich eine pulmonale Beteiligung, was in anderen Studien eher mit einer Anti-MDA5-jDM oder einem ASyS assoziiert wird. Dagegen zeigten die Patient*innen mit ASyS keine Lungenbeteiligung. (Cerbelli et al., 2018; Lundberg et al., 2021; McHugh/Tansley, 2018; Rider/Nistala, 2016; Rider, 2011; Stenzel et al., 2021; Tanboon et al., 2020; Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013; Wedderburn/Rider, 2009; Wu/Lu/Reed, 2020) Diese Befunde bestätigen die Empfehlung der DGN-Leitlinie von

2022, wonach eine detaillierte klinische Untersuchung und Bestimmung von MSA und MAA erfolgen sollte, jedoch bei allen Myositiden auf extramuskuläre Symptome, wie z.B. eine Dysphagie, pulmonale sowie kardiale Beteiligung geachtet werden soll, unabhängig vom AK-Status (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022). Es ist wichtig eine Analyse des AK-Status in Zukunft routinemäßig bei dem Verdacht auf eine jIIM durchzuführen, damit eine exakte integrative Diagnose gestellt werden kann und weitere AK-abhängige Symptome und Prognosen an größeren Kohorten verifiziert werden können. Dadurch könnten zukünftig Behandlungsoptionen individuell angepasst und verbessert werden (Mariampillai et al., 2018; Rider/Nistala, 2016; Tanboon et al., 2020).

4.4 Morphologische Charakteristika in der Skelettmuskulatur bei juveniler Myositis

Die morphologische Aufarbeitung von Skelettmuskelbiopsien ist von entscheidender Bedeutung, um neue Erkenntnisse über mögliche Pathomechanismen der Erkrankung zu gewinnen sowie die Diagnostik und Therapiestrategien zu verbessern (Tanboon et al., 2020). Erschwerend für eine Klassifizierung der jIIM ist, wie bereits Tansley et al. und Soponkanaporn et al. beschrieben, dass ausführliche klinische, serologische und morphologische Analysen bei juvenilen Patient*innen sehr limitiert sind und oft auch nur auf Fallberichten basieren (Soponkanaporn et al., 2019; Tansley/McHugh/Wedderburn, 2013). Deswegen war Ziel der vorliegenden Studie, eine ausführliche morphologische Untersuchung der Skelettmuskelbiopsien von Patient*innen mit jIIM durchzuführen. Es wurde eine detaillierte Analyse durchgeführt, die insgesamt 31 verschiedene Parameter umfasst, einschließlich immunhistochemischer und ultrastruktureller Begutachtung. Eine solche umfangreiche Analyse ist bisher noch nicht durchgeführt worden. Von einer Mehrheit der Färbungen wurde eine Reevaluation von bereits vorhandenen Färbungen des bestehenden diagnostischen Panels an Färbungen durchgeführt. Zudem wurden ergänzend die MxA-Färbungen von allen Biopsien durchgeführt, da diese im Verlauf der Studie zum Repertoire der diagnostischen Färbungen von Muskelbiopsien aufgenommen wurden. Neben einem modifizierten VAS-Score-System nach Wedderburn et al. und Varsani et al. wurde eine leicht verständliche Fünf-Punkte-Skala verwendet für die Bewertung der pathologischen Ausprägung (siehe 2.3.3) (Varsani et al., 2015; Wedderburn et al., 2007). Mithilfe einer explorativen Datenanalyse konnten auch in einer Kohorte mit begrenzter Stichprobengröße Hinweise auf systematische Unterschiede zwischen dem VAS-Score der verschiedenen untersuchten Subgruppen gezeigt werden.

Hinweise bestehen, dass eine Anwendung des VAS-Score in größeren Studien sich als hilfreiches morphologisches Mittel erweisen könnte (siehe Methodendiskussion). In dieser Arbeit konnten einige gemeinsame morphologische Merkmale bei allen untersuchten jIIM-Subtypen beschrieben werden, u. a. eine sarkolemmale Hochregulation von MHC 1 und MHC 2, Ödembildung, Nekrose-, Regenerationsprozesse und eine lymphomonozytäre Infiltration von inflammatorischen Zellen. Im Vergleich zu anderen Studien waren B-Lymphozyten in unserer DM-Kohorte nicht der vorherrschende Zelltyp, sondern traten auch bei Anti-Jo1-ASyS und OM auf (Sag et al., 2021). Diese Ergebnisse gleichen den unspezifischen morphologischen Veränderungen, die Dubowitz (2021) für die Muskelbiopsien der IIM beschreibt, u.a. das Vorhandensein von inflammatorischen Zellen, einer gesteigerten Fibrosierung, Nekrose und einer sarkolemmalen Hochregulation von MHC 1 aus (Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S.187). Merkmale der IIM-Subtypen sind bisher v.a. an Studien von adulten Fällen charakterisiert worden (Bitencourt et al., 2020; Cerbelli et al., 2018; Dalakas, 2015; Damoiseaux et al., 2022; Dubowitz/Sewry/Oldfors, 2021, S.187; Greenberg et al., 2005; Kassardjian et al., 2015; Siegert et al., 2021). In den folgenden Abschnitten werden einige spezifische Morphologien detaillierter betrachtet und mit den Ergebnissen dieser Studie verglichen.

4.5 Die Bedeutung von Myxoprotein A und die Regulation von Interferon bei jDM und ASyS

Die Hochregulation von IFN1 spielt eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese von jIIM. Hemmende Regulatoren, wie z.B. ISG15 (*Interferon-stimulated-gene 15*) korrelieren negativ mit der Schwere der Muskelpathologie und positiv mit dem klinischen Outcome. (Baechler/Bilgic/Reed, 2011; Franzi et al., 2013; Greenberg et al., 2005; Hou et al., 2021; Saponkanaporn et al., 2019; Stenzel et al., 2021; Tezak et al., 2002; Wong et al., 2012) MxA als Surrogatmarker von IFN zeigt bei Fällen mit DM eine höhere Spezifität und Sensitivität als z.B. die perifaszikuläre Atrophie und wird im internationalen Konsens für die Diagnostik von Muskelbiopsien empfohlen (Benveniste/Goebel/Stenzel, 2019; Greenberg et al., 2005; Mammen et al., 2020; Saponkanaporn et al., 2019; Tanboon et al., 2020; Uruha et al., 2019). Eine perifaszikuläre Hochregulation von MxA war auf allen von unseren Biopsien von jDM zu finden, bis auf einem Fall mit generell milder Pathologie und geringer klinischer Symptomatik. Die Patientin stand zum Zeitpunkt der Biopsie bereits unter immunsupprimierender Therapie. Laut Walsh et al. kann eine

Immunsuppression, z.B. mit Kortikosteroiden oder Methotrexat, Auswirkung auf den IFN1 Signalweg haben, was eine Erklärung für eine verringerte Expression von MxA bei dieser Biopsie sein könnte (Walsh et al., 2007). Jedoch zeigte eine andere Patientin, die ebenfalls unter immunsupprimierender Therapie stand, eine schwer ausgeprägte Pathologie und eine starke perifaszikuläre Hochregulation von MxA, was sich mit den Ergebnissen immunsupprimierter Biopsien von Soponkanaporn et al. deckt (Soponkanaporn et al., 2019). Eine starke Expression von MxA auf den Muskelfasern und kleinen Gefäßen zeigten auch die Biopsien mit Anti-Jo1-ASyS, wohingegen Fälle mit Anti-PL7-ASyS nur schwache Expression vereinzelter Muskelfasern oder gar keine Expression zeigten. Diese Befunde decken sich mit Ergebnissen anderer Studien, die zeigen, dass eine Expression von MxA bei Fällen mit ASyS die Möglichkeit einer gemeinsamen oder überlappenden (Typ 1 und/oder Typ 2) IFN-bezogenen Pathogenese bei DM und ASyS aufweisen könnte, da v.a. Fälle mit Anti-Jo1-ASyS verglichen mit anderen IIM signifikant höhere IFN-Werte aufwiesen (Ekholm et al., 2016; Inoue et al., 2019). Wobei in Betracht gezogen werden muss, ob die höheren IFN-Werte aufgrund eines unspezifischen Vorhandenseins von inflammatorischen Zellen bestehen oder diese durch die Muskelfaserpathologie selbst induziert wurden (Lahoria/Selcen/Engel, 2016; Preuße et al., 2016). Therapien über den IFN-Signalweg, z.B. durch JAK-Inhibitoren, zeigten große Erfolge bei therapierefraktären Fällen von DM (Ladislau et al., 2018; Paik et al., 2021; Patwardhan/Spencer, 2021).

4.6 Veränderungen der endomysialen Gefäße als wichtige Komponente in der Pathogenese von jDM

Veränderungen der endomysialen Gefäße mit einer konsekutiven Funktionsstörung (Vaskulopathie) werden eine zentrale Rolle in der Pathogenese von jDM zugeschrieben (Papadopoulou et al., 2021). Vermutet wird ein komplexer Prozess aus einer entzündlichen Vaskulitis in der aktiven Krankheitsphase (Baechler et al., 2007; Papadopoulou et al., 2021; Preuße et al., 2016; Whitaker/Engel, 1972) und einem Kapillarverlust im weiteren Krankheitsverlauf durch eine nichtentzündliche okkludierende chronische Vaskulopathie (Emslie-Smith/Engel, 1990; Lahoria/Selcen/Engel, 2016; Mamyrova et al., 2007; Papadopoulou et al., 2021). Schwere vaskuläre Veränderungen sind einhergehend mit einer ungünstigeren Prognose, einem chronischen Krankheitsverlauf, dem Vorhandensein von extramuskulären Manifestationen und können zu einem erhöhten kardiovaskulären Morbiditätsrisiko im

Erwachsenenalter führen (Gitiaux et al., 2015; Mamyrova et al., 2007; McCann et al., 2022; Papadopoulou et al., 2021; Tisseverasinghe/Bernatsky/Pineau, 2009; Zöller et al., 2012). Bei der jDM sind die Marker für eine Endothelschädigung oft erhöht, einhergehend mit einem reduzierten Kapillarnetzwerk (z.B. CD 31) und einer verstärkten Neovaskularisation (z.B. VEGF) (Baumann et al., 2018; Gitiaux et al., 2015; Grundtman et al., 2008; Papadopoulou et al., 2021). Es wird angenommen, dass die Vaskulopathie durch IFN-induzierte Prozesse und/oder mediiert durch das Komplementsystem verursacht wird, was einen Kapillarverlust zur Folge haben kann. Eine resultierende Hypoperfusion kann der Grund einer gestörten Faserarchitektur und Atrophie darstellen. Wobei ungeklärt ist, ob diese Prozesse unabhängig voneinander bestehen oder sich gegenseitig bedingen. (Dalakas, 2015; Lahoria/Selcen/Engel, 2016; Preuße et al., 2016; Rider/Nistala, 2016) Oft zeigt sich bei der jDM morphologisch neben einem Verlust von endomysialen Gefäßen, v.a. in den perifaszikulären atrophischen Bereichen der Muskelbiopsien, eine Expression von pro-angiogenen VEGF, hinweisend auf eine Hypoxie und einen konsekutiven Anstieg von Regenerationsprozessen (Grundtman et al., 2008; Preuße et al., 2016). In dieser Arbeit zeigte sich eine verstärkte Gefäßpathologie (VEGF, kapilläre c5b-9 Ablagerungen, TRE) und Muskelfaserregeneration (MHCD, CD 56) bei den Patient*innen mit jDM. Die Muskelbiopsien präsentierten eine gestörte Muskelfaserpathologie (Myotilin, TEM) und ultrastrukturelle tubuloretikuläre Einschlüsse (TRE) in den Endothelzellen. TRE sind unabhängig von assoziierten AK bereits in einem frühen Krankheitsstadium ein charakteristischer ultrastruktureller Befund in den Biopsien von adulten DM-Patient*innen und können einer Infiltration von entzündlichen Zellen voraus gehen (Benveniste/Goebel/Stenzel, 2019; Bronner et al., 2008; De Visser/Emslie-Smith/Engel, 1989). Dabei handelt es sich um tubuläre Aggregate, die sich zu Einschlüssen im Zytoplasma von endomysialen Endothelzellen auffinden, oft in der Nähe des endoplasmatischen Retikulums oder der äußeren Kernmembran (Banker, 1975). In einer der Untersuchung von jDM, SLE-Patient*innen u.a. Kollagenosen mit begleitender OM konnten diese TRE auch gezeigt werden (Bronner et al., 2008; Carpenter et al., 1976; Yasin et al., 2014). Solche Veränderungen in dem intramuskulären Endothel der endomysialen Gefäße stützen die Hypothese, dass Patient*innen mit DM und auch OM eine gemeinsame immunvermittelte mikrovaskuläre Pathogenese aufweisen könnten (Bronner et al., 2008). Interessanterweise zeigte sich eine vaskuläre Pathologie ähnlich der jDM in den Biopsien von Anti-Jo1-ASyS-Fällen in dieser Studie. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit den Befunden aus einer Studie an

adulten Anti-Jo1-ASyS-Patient*innen von Mescam-Mancini et al. vereinbaren (Mescam-Mancini et al., 2015). Es zeigte sich, wie bei den Fällen mit jDM, eine verstärkte Vaskulopathie mit kapillären Komplementablagerungen, einem Kapillarverlust und ultrastrukturell die Präsenz von TRE. Dazu wiesen diese Fälle auch einen Anstieg an regenerativen Prozessen v.a. in den perifaszikulären Bereichen auf. Die morphologische Ähnlichkeit dieser beiden Subtypen, auch in Hinblick zu weiteren Befunden wie eine MxA-Hochregulation in den perifaszikulären Bereichen, lässt eine gemeinsame Pathologie, möglicherweise in einem Zusammenhang zum IFN-Signalweg, vermuten (Greenberg et al., 2005; Hoogendijk et al., 2004; Ladislau et al., 2018; Mescam-Mancini et al., 2015; Preußé et al., 2016; Tanboon et al., 2020; Uruha et al., 2019). In den Biopsien der beiden OM-Fälle konnten, entgegen mancher Beobachtungen in der Literatur (Bronner et al., 2008; Carpenter et al., 1976), keine TRE gefunden werden. Es wird angenommen, dass Schäden von Endothelzellen durch eine direkte Bindung von C1q und somit durch eine Aktivierung der klassischen Komplementsystemkaskade ausgelöst werden kann, wodurch mikrovaskuläre Ablagerungen des Membranangriffskomplexes bei der DM entstehen können (Dalakas, 2015; Lahoria/Selcen/Engel, 2016). Diese kapillären Ablagerungen von c5b-9 ließen sich in dieser Kohorte sowohl bei Biopsien mit jDM als auch Anti-Jo1-ASyS feststellen. In einer Studie von Yasin et al. zeigte sich die Verteilung von kapillären Komplementablagerungen sehr heterogen bei den verschiedenen MSA-Subtypen in jIIM. Beispielsweise zeigten v.a. NXP2-positive und seronegative jDM kapilläre c5b-9 Ablagerungen, wohingegen Fälle mit PL7-ASyS weder sarkolemmale noch kapilläre Ablagerungen aufwiesen, was sich mit den Beobachtungen in dieser Studie deckt. (Yasin et al., 2019) Patient*innen mit Anti-Jo1-ASyS zeigten zudem auch sarkolemmale Komplementablagerungen mit einer stark perifaszikulär betonten Expression. Dies bestätigt die Hypothesen in anderen Publikationen, die auf ein spezifisches myopathologisches Muster in Biopsien von Patient*innen mit Anti-Jo1-ASyS hinwiesen, möglicherweise ausgelöst einen durch IFN1 ausgelösten Prozess (Franzi et al., 2013; Lahoria/Selcen/Engel, 2016; Mescam-Mancini et al., 2015).

4.7 COX-negative Fasern in jDM-Biopsien als Marker für eine Störung der OXPHOS

Eine enzymhistochemische Defizienz der COX (Komplex IV der Atmungskette) bei erhaltener Aktivität der SDH (Komplex II) in den perifaszikulären Bereichen der Muskelfasern ist ein morphologisches Merkmal von adulter und juveniler DM (Alhatou

et al., 2004; Hedberg-Oldfors et al., 2022; Miro, 1998; Preuße et al., 2016; Woo/Chung/Nonaka, 1988). Es besteht die Hypothese, dass eine mitochondriale Dysfunktion eine wichtige Rolle in der Pathologie der DM spielen könnte, da eine Störung in der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) zu einer Verminderung des kapillären Blutflusses und zu einer verringerten maximalen aeroben Kapazität führen kann (Cea, 2002; Hedberg-Oldfors et al., 2022; Miro, 1998; Wiesinger et al., 2000), wobei der genaue Mechanismus noch ungeklärt ist. Es wird anhaltend diskutiert, ob es sich bei den COX-negativen Fasern nur um eine unspezifische Anfärbung von atrophischen Fasern handelt, ein chronisch ischämischer Prozess besteht oder Änderungen der mitochondrialen DNS zu Dysfunktionen führen könnten (Cerbelli et al., 2018; Hedberg-Oldfors et al., 2022; Meyer et al., 2018; Miro, 1998). Gegebenenfalls könnte auch eine durch IFN1 ausgelöste Inflammation beteiligt sein (Dalakas, 2015; Jiang et al., 2021; Lahoria/Selcen/Engel, 2016; Meyer et al., 2017; Meyer et al., 2018). Es zeigte sich, dass IFN-induzierte reaktive Sauerstoffspezies und mitochondriale Schäden zu einer Beeinträchtigung der Skelettmuskulatur und der Aufrechterhaltung von Entzündungen bei der DM beitragen (Meyer et al., 2017). Auch in dieser Studie zeigten sich COX-negative Fasern ausschließlich in Biopsien von Patient*innen mit jDM. Ultrastrukturell zeigten sich in dieser Arbeit moderate mitochondriale Veränderungen in Biopsien von jDM, Anti-PL7-ASyS und OM.

4.8 Eine Hochregulation von p62 und LC3 kann auf einen Pathomechanismus durch Störung der Autophagie hinweisen

Die Autophagie ist ein wichtiger Prozess zur Aufrechterhaltung der Homöostase in den Zellen. Skelett- und Herzmuskelzellen stehen unter enormen mechanischen, thermischen und oxidativen Stress während der Kontraktion, was zu einer Ansammlung von beschädigten Organellen und fehlgefalteten Proteinen führen kann. Zur Erhaltung der zellulären Struktur ist die Muskulatur auf ein funktionierendes Proteostasenetzwerk angewiesen. (Arndt et al., 2010) Ist dieser regulierte Prozess gestört, kann das zu so genannten loss-of-function Effekten oder zu einer Akkumulation von zytotoxischen Proteinaggregaten führen, welche die Ursache verschiedenster Erkrankungen und degenerativer Störungen sein kann (Hipp/Park/Hartl, 2014), u.a. sind myofibrilläre Myopathien im Kindesalter, die sowohl von einer skelettalen, als auch eine kardialen Muskelbeteiligung betroffen sein können, mit einer gestörten Autophagie und einer Hochregulation von p62 und LC3 in der Herzmuskelbiopsie assoziiert (Schänzer et al.,

2018). P62-positive Einschlüsse in Muskelfasern gelten als unspezifisches Anzeichen einer Muskelverletzung, was nicht nur bei inflammatorischen Myopathien beobachtet wurde, sondern auch bei anderen Myopathien und neurogenen Atrophien (Schänzer et al., 2018). Biopsien, die von einem schwereren Muskelschaden betroffen waren, zeigten dabei eine verstärkte Expression (Milisenda et al., 2020). Da die immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen p62 charakteristische Muster bei Patient*innen mit IMNM oder IBM zeigten und bereits als diagnostisches Mittel genutzt wird, ist es durchaus möglich, dass diese diffuse Stressreaktion mit verstärkter dysregulierter Autophagie, auch bei anderen IIM oder weiteren Erkrankungen eine Rolle spielen kann (Fischer et al., 2020). In dieser Arbeit zeigten nur wenige Fälle mit jDM und Anti-Jo-1-ASyS eine erhöhte Expression der autophagischen Marker p62 und LC3. Diese Fälle wiesen insgesamt eine stärker betroffene Muskelfaserpathologie (VAS-Score) auf, was vereinbar ist mit den Ergebnissen aus Milisenda et al., dass eine generelle Disruption des Muskels zu einer unspezifischen Akkumulation von p62 führen kann (Milisenda et al., 2020).

4.9 Morphologische und klinische Merkmale des Antisynthetasesyndroms

Das ASyS ist eine seltene Mischkollagenose, die häufig einhergeht mit einer Myositis, Arthritis, ILD, Fieber, Hautbeteiligungen (Raynaud Phänomen und Mechaniker Hände) und ist durch spezielle AK gegen verschiedene Antisynthetasen gekennzeichnet (Cavagna et al., 2019). AK gegen Anti-Jo1 sind die am häufigsten diagnostizierten MSA in adulten Patient*innen (Cerbelli et al., 2018; Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022; Gunawardena/Betteridge/McHugh, 2009; Mescam-Mancini et al., 2015). Dagegen präsentiert sich das ASyS eher selten im Kindesalter (siehe Tab. 1) (Cavagna et al., 2019; Pinal-Fernandez et al., 2017; Tanboon et al., 2020). Die Einordnung des ASyS als eigene Entität der IIM oder als Unterform der OM oder DM ist weiterhin in Diskussion (Damoiseaux et al., 2022; Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022; Fredi/Cavazzana/Franceschini, 2018). In dieser Arbeit konnten spezifische morphologische Merkmale des ASyS hervorgehoben werden. Auffällig zeigte sich bei Anti-Jo1-ASyS, wie bereits in anderen Publikationen beschrieben, v.a. peripher betonte Muskelfaseruntergänge und Regenerate, sarkolemmale c5b-9 Ablagerungen, eine Hochregulation von MHC I und eine vorwiegend monozytäre Inflammation (Cerbelli et al., 2018; Mescam-Mancini et al., 2015; Tanboon et al., 2020). Die vaskuläre Pathologie zeigte sich sehr ähnlich der jDM mit kapillären Komplementablagerungen,

Kapillarverlust (CD31) und TRE. Eine Hochregulation von ALP gilt als histologisches Kennzeichen des ASyS im Erwachsenenalter (Cerbelli et al., 2018; Mescam-Mancini et al., 2015; Mozaffar/Pestronk, 2000; Tanboon et al., 2020). Unsere Anti-Jo1-ASyS Fälle zeigten ein perimysial betontes Färbemuster der ALP, was bestätigen würde, dass die ALP-Färbung mit einer hohen Sensitivität und Spezifität als hilfreicher diagnostischer Marker des Anti-Jo1-ASyS, auch bei juvenilen Patient*innen, gilt. Weder die Kontrollgruppe noch die anderen jIIM-Patient*innen in dieser Studie, einschließlich der Anti-PL7-ASyS, zeigten eine positive ALP-Färbung. Jedoch schließt eine unauffällige Färbung der ALP ein ASyS nicht aus und laut Literatur zeigte sich die Färbung in „nur“ ca. 90 % der Fälle positiv (Mescam-Mancini et al., 2015; Mozaffar/Pestronk, 2000). Wahrscheinlich ist die Anfärbung kein Hinweis auf die Ursache der Erkrankung, könnte jedoch, wie Cerbelli et al. auch beschrieben, einen Hinweis auf einen starken nekrotischen Prozess mit konsekutiver Hochregulation von Regeneration geben, der vermutlich zu diesem perimysialen Färbungsmuster führen könnte (Cerbelli et al., 2018). Interessanterweise zeigten die Daten dieser Studie unterschiedliche klinische und morphologische Charakteristika bei Patient*innen mit Anti-Jo1- und Anti-PL7-ASyS, so dass zukünftig weitere Analysen in einer größeren Kohorte stattfinden sollten. Es unterstreicht, dass es immer noch keine offizielle Kategorisierung der ASyS als eigene Entität der IIM vorliegt (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022; Tanboon et al., 2020). Keiner der ASyS Patient*innen zeigte eine, wie in der Literatur bei v.a. adulten Patient*innen, oft beschriebene pulmonale Beteiligung oder Arthritis (Cavagna et al., 2019; Cerbelli et al., 2018; Mescam-Mancini et al., 2015; Mozaffar/Pestronk, 2000; Tanboon et al., 2020).

4.10 Overlapmyositis

Die OM kann als Krankheit definiert werden, bei der die klinischen Merkmale einer IIM mit einer oder mehr Bindegewebserkrankungen, wie z.B. einem SLE, SSc oder Sjögren-Syndrom, überlappen und häufig mit AK einhergehen kann (Fredri/Cavazzana/Franceschini, 2018; Rider/Nistala, 2016). Die Diagnosestellung einer OM wird oft durch das heterogene Bild von klinischen und serologischen Merkmalen erschwert. Hinzu kommt, dass Kollagenosen oft als Erkrankungen des mittleren und höheren Alters angesehen wurden. Jedoch zeigte sich, dass beispielsweise SLE in fast 15 % der Fälle unter 16 Jahren diagnostiziert wird und das mit oft schwereren Krankheitsverläufen. Interessanterweise zeigte bis zu einem Drittel dieser Patient*innen

eine Beteiligung der Skelettmuskulatur. (Bitencourt et al., 2020; Record/Beukelman/Cron, 2011; Rider/Nistala, 2016) In dieser Arbeit konnten nur zwei Patient*innen mit SLE und begleitender OM eingeschlossen werden. Klinisch präsentierte sich diese ähnlich zu den anderen IIM-Unterformen mit einer Erhöhung der CK, proximaler Muskelschwäche, Myalgie und DM-charakteristischen Hautsymptomen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022; Rider/Nistala, 2016). Extramuskuläre Symptome, die oft auf die zugrundeliegende Kollagenose zurückzuführen sind, wie z.B. ein Raynaud-Phänomen, Arthritis, Sklerodaktylie, Dysphagie oder eine ILD (Aguila et al., 2014; Fredi/Cavazzana/Franceschini, 2018; Naveen et al., 2021; Rider/Nistala, 2016), traten bei diesen Patient*innen nicht auf. Bei den mit OM-assoziierten AK handelte es sich vor allem um ANA, Anti-RNP und Anti-Sm, wobei auch das Auftreten von MSA und MAA möglich ist (Bitencourt et al., 2020; Record/Beukelman/Cron, 2011; Rider/Nistala, 2016). Laut Record et al. waren die Myositisfälle weniger mit Anti-dsDNS assoziiert als mit Anti-RNP, was bei den zwei Patient*innen in dieser Studie bestätigt werden konnte (Record/Beukelman/Cron, 2011). Die Muskelpathologie von juvenilen OM-Fällen wurde bisher nicht im Detail analysiert, was v.a. an den limitierten Daten von pädiatrischen Patient*innen liegt (Bitencourt et al., 2020). Im Fall von SLE-Patient*innen liegt das auch an einer Unterdiagnostizierung einer begleitenden OM, da Myositis noch nicht Teil der SLE ACR/EULAR Kriterien ist (Aringer, 2019), obwohl ca. 4-16 % der adulten Patient*innen eine begleitende OM aufweisen (Record/Beukelman/Cron, 2011). In dieser Kohorte zeigten die Biopsien gemeinsame Merkmale zu den jIIM, dazu gehörten eine Hochregulation von MHC I, unspezifische inflammatorische Veränderungen und Ödembildung mit einem insgesamt moderat ausgeprägten VAS-Score. In der Literatur zeigte sich neben einer Inflammation auch eine Vaskulitis und perifaszikuläre Atrophie bei SLE Patient*innen (Bitencourt et al., 2020; Oxenhandler et al., 1982). Ultrastrukturell konnten TRE, v.a. bei Patient*innen mit SLE, gefunden werden (Bitencourt et al., 2020; Bronner et al., 2008; Carpenter et al., 1976). Dies konnte in unseren beiden Fällen jedoch nicht beobachtet werden. Bei der MxA-Färbung zeigten sich bei einem Patienten (P3) vereinzelte schwach positive Fasern, die keinem perifaszikulären Verteilungsmuster folgten. Dies unterstützt die Hypothese einer Hochregulation von IFN Typ I in juvenilen SLE-Fällen, wobei die Rolle von IFN in der Pathophysiologie von SLE weiterhin ungeklärt bleibt (Melki et al., 2020; Turnier et al., 2021; Wong et al., 2012).

4.11 Diskussion der Methoden und Limitationen der Studie

Die Patientendaten der hier vorliegenden Studie wurden retrospektiv über einen Zeitraum von 16 Jahren analysiert, sodass sich einige Einschränkungen ergaben. Zum einen fehlten Informationen zu den Patient*innen und diese konnten im Nachhinein nicht ermittelt werden. Daher waren z.B. MSA nicht für alle Patient*innen in dieser Arbeit verfügbar, was v.a. an der Entwicklung der Diagnostik von IIM in der Zeit von 2002 bis 2018 lag, da eine routinemäßige Einbeziehung von MSA in der Diagnostik von IIM zu Beginn nicht durch internationale Studien unterstützt und erst später in internationale Klassifizierungskriterien aufgenommen wurde (Bonroy et al., 2022; Bottai et al., 2017). In dieser Dissertation handelte es sich um eine single-zentrische Studie einer sehr seltenen Erkrankung, sodass es sich insgesamt um eine kleine Kohorte handelte (n=15, 7 Kontrollfälle). Es war nicht möglich, von allen jIIM-Subtypen Patient*innen in diese Studie einzuschließen (keine Fälle mit IMNM), außerdem waren bei Kindern mit OM nur Patient*innen mit SLE eingeschlossen, was v.a. der Seltenheit dieser Erkrankungsgruppe geschuldet war. Die niedrige Stichprobengröße schwächte eine statistische Aussagekraft und die Fähigkeit „signifikante“ Effekte in dieser Kohorte formal zu identifizieren. So wurde für den Großteil des Ergebnisteils eine deskriptive Beschreibung gewählt. Bei der Untersuchung des VAS-Score wurde eine Interpretation der Werte im Sinne einer explorativen Datenanalyse durchgeführt zur Unterscheidung von systematischen Auffälligkeiten zwischen den jIIM-Subgruppen. Nach Durchführung eines KWT und dem anschließenden paarweisen Vergleich durch einen Dunn-Test schien es, dass der VAS-Score sich nicht systematisch zwischen den Gruppen unterscheidet. Jedoch zeigten sich Hinweise, dass die Kontrollgruppe sich zu der Gruppe von jDM, Anti-Jo1-ASyS und OM unterscheidet. Diese Werte suggerieren zwar einen eindrucksvollen Unterschied, sind aber aufgrund des geringen Stichprobenumfangs mit Vorsicht zu interpretieren. Es bedarf weiterer Daten, um dieses Ergebnis zu stützen oder zu falsifizieren. Es wäre wünschenswert, wenn ähnliche zukünftige Analysen an einer größeren, ggf. multizentrischen, Studienkohorte durchgeführt werden könnten, sodass die Ergebnisse nicht nur deskriptiv, sondern auch formal untersucht werden könnten.

So ist es dennoch wichtig, in die Forschung und auch in deskriptive Ergebnisse von seltenen Erkrankungen zu investieren, da es sich nicht nur um Aufmerksamkeit auf die Krankheitslast von wenigen Fällen handelt, sondern auch um eine nicht unerhebliche Belastung für die Gesellschaft (hohe Sterblichkeitsraten, Behinderungen, hohe

Einweisungsraten in Krankenhäuser und Pflegeeinrichtungen) (Ferreira, 2019). Ein besseres Verständnis von seltenen Erkrankungen bildet die Grundlage für genaue Prognosen sowie deren Management und es wichtig, die Forschung zu unterstützen um neue Therapien anzuregen (Wright/Fitzpatrick/Firth, 2018).

Trotz einer geringen Stichprobengröße konnten in dieser Studie morphologische und morphometrische Unterschiede zwischen den verschiedenen Untergruppen der jIIM beschrieben und visualisiert werden, die sich für die Entscheidung von Diagnose- und Klassifizierungskriterien hilfreich zeigten. Entscheidend dafür war die verblindete Auswertung der Biopsien von den gleichen untersuchenden Neuropathologen mithilfe eines leicht verständlichen Scoring-Systems, angelehnt an den VAS-Score von Wedderburn et al. und Varsani et al. (Varsani et al., 2015; Wedderburn et al., 2007), und die standardisierte Aufarbeitung der Muskelproben im Institut für Neuropathologie in Gießen - z.B. durch die routinierte Durchführung von Standardfärbungen, Enzym- und Immunhistochemie. Da die meisten Färbungen und für die EM benötigten Ultradünn- und Semidünnschnitte bereits zur etablierten Muskeldiagnostik vorlagen, war die Ergänzung der für diese Studie benötigten Färbungen, wie z.B. VEGF und MxA, unkompliziert und konnte einfach in den bestehenden klinischen Diagnostikalltag des Labors integriert werden. Durch Nutzung eines IHC-Färbeautomatiksystems sind die IHC-Färbungen standardisiert bei allen Proben gleich. Da eine Beteiligung von IFN an der Pathologie von manchen IIM Subtypen als möglich betrachtet wird und es Hinweise gibt, dass eine weitere Untersuchung den Outcome der Erkrankung und möglicherweise zu einer weiteren Differenzierung der verschiedenen IIM Entitäten beitragen könnte (Baechler/Bilgic/Reed, 2011), sollte in Betracht gezogen werden, in Zukunft weitere Färbungen von IFN-modulierenden Proteinen wie ISG15 in das bestehende Färberepertoire aufzunehmen (Hou et al., 2021). Außerdem wäre eine Analyse von IFN nicht nur am Skelettmuskel, sondern auch im Blutserum der Patient*innen von Interesse, da u.a. eine Studie von Melki et al. von einer Korrelation von IFN α zur Krankheitsaktivität von jDM, SLE und anderen juvenilen OM-Formen berichtete (Mathian et al., 2020; Melki et al., 2020).

Die klinischen Untersuchungen und die erweiterte Diagnostik fanden in der Neuropädiatrie des Universitätsklinikums Gießen statt. Hierbei handelte es sich um ein Kompetenzzentrum für neuromuskuläre Erkrankungen im Kindesalter und einer angeschlossenen neuromuskulären Ambulanz, die in der Diagnostik und Therapie von

juvenilen Myositiden erfahren sind. Dafür ist ein interdisziplinäres Team erforderlich, welches die Expertise dieser seltenen Krankheitsgruppe besitzt und geschult ist in den weiterführenden Untersuchungen, wie z.B. der Elektrophysiologie, der bildgebenden Diagnostik und der Bestimmung von speziellen Antikörpern. Da es sich um ausschließlich ein Zentrum für die Untersuchungen handelte, konnten Störfaktoren klein gehalten werden und ein Vorteil war der einfache Zugang zu allen Patientendaten. Bei der Biopsieentnahme wäre es zwar wünschenswert, diese vor Beginn einer immunsupprimierenden Therapie durchzuführen, da dies möglicherweise Auswirkungen auf die Pathologie der Muskelbiopsie zeigen kann (Carpenter et al., 1976; Walsh et al., 2007), so stehen die Patient*innen selbst und deren Leid immer an erster Stelle und sollten bei einer fulminant verlaufenden Myopathie eine sofortige immunsupprimierende Behandlung ohne Verzögerungen erhalten. In dieser Studie wurde bei der Mehrheit der Fälle (13/15) eine Biopsie vor Beginn einer Therapie durchgeführt.

4.12 Fazit und Ausblick

Die Klassifizierung von IIM hat sich in den vergangenen Jahren stetig weiterentwickelt. Neben einer klinischen Untersuchung und der Bestimmung von spezifischen Autoantikörpern besitzt die Analyse der Skelettmuskelbiopsie mithilfe von einem breiten Repertoire an Spezialfärbungen einen hohen diagnostischen Stellenwert. Dies hat sich als hilfreich erwiesen, um Subtyp-spezifische Pathogenesewege der IIM besser zu verstehen, bessere Aussagen über die Prognose treffen zu können und damit die Therapieoptionen zu verbessern. Es hat sich gezeigt, dass die jIIM trotz vieler Gemeinsamkeiten zu den adulten Formen als eigene Entität angesehen werden sollte, mit einer eigenen angepassten Klassifikation. Aufgrund der Seltenheit der Erkrankungen erweist sich eine solche Charakterisierung jedoch als schwierig, da beispielsweise ausführliche morphologische Untersuchungen mit einem breiten Sortiment an speziellen Färbungen bisher nur an kleineren Gruppen von juvenilen Patient*innen durchgeführt wurden (Aouizerate et al., 2018; Bitencourt et al., 2020; Carpenter et al., 1976; Cerbelli et al., 2018; Preuße et al., 2016; Sag et al., 2021; Soponkanaporn et al., 2019; Turnier et al., 2021; Wedderburn et al., 2007; Woo/Chung/Nonaka, 1988; Yasin et al., 2019).

Nichtsdestotrotz sollten in größer angelegten Studien die Methoden dieser Arbeit weitergeführt werden zur Entwicklung einer eigenen Klassifizierung für jIIM und ggf. von eigenen Leitlinien und angepassten Therapien. In dieser Studie wurde die fundamentale Rolle einer Muskelbiopsie und die Bestimmung von MSA in der

Diagnostik und der integrativen Klassifizierung von jIIM verdeutlicht. Es zeigten sich sowohl morphologische als auch klinische Unterschiede zwischen den verschiedenen jIIM-Subtypen, aber auch Hinweise auf einen überlappenden pathophysiologischen Weg. Die wissenschaftlichen Erkenntnisse dieser Studien sollen dazu dienen, Ansätze für neue Behandlungsoptionen zu inspirieren, um die Prognose von jIIM zukünftig zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Die jIIM bilden eine heterogene Gruppe von seltenen systemischen Autoimmunerkrankungen im Kindesalter und sollten als eigene Entität zu den adulten Formen abgegrenzt werden. Das klinische Bild wird charakterisiert von einer Muskelschwäche, einer chronischen Skelettmuskelentzündung und einer Vielzahl von extramuskulären Begleitsymptomen. Trotz einer enormen Entwicklung in den letzten Jahren bleiben die genauen Pathomechanismen ungeklärt und es besteht kein internationaler Konsens in der Klassifizierung der Erkrankung, was sich entscheidend auf die Prognose und Therapie der Patient*innen auswirkt.

In dieser Studie wurden die Skelettmuskelbiopsien von 15 Patient*innen mit jIIM (medianes Alter 8 Jahre, Spannweite 3 – 17 Jahre, 73 % weiblich) und sieben altersadaptierten Kontrollbiopsien mithilfe von Standardfärbungen, IHC und TEM untersucht. Detaillierte klinische und laborchemische Daten wurden retrospektiv erfasst. Die Mehrheit der Patient*innen präsentierten eine proximale Muskelschwäche und Hautsymptome. DM wurde bei 9/15, ASyS bei 4/15 und OM bei 2/15 der Patient*innen diagnostiziert. In der Analyse der Muskelbiopsien zeigten sich eine Einwanderung von inflammatorischen Zellen, verstärkte nekrotische und regenerative Prozesse, sowie eine Hochregulation von MHC 1 und 2. Die morphologische Kernmerkmale bildeten COX-defiziente Fasern als distinkte Pathologie der DM und perimysiale Ablagerungen von ALP bei Anti-Jo1-ASyS. Außerdem zeigten diese Subtypen eine sarkolemmale Hochregulation des IFN-Surrogatmarkers MxA, kapilläre c5b-9-Ablagerungen, einen Verlust von endomysialen Kapillaren und ultrastrukturell TRE. Keiner dieser spezifischen Befunde ließ sich in den Biopsien von Anti-PL7-ASyS oder OM nachweisen.

Eine ausführliche klinische und morphologische Untersuchung von IIM kann hilfreich sein, um die verschiedenen jIIM-Subtypen zu charakterisieren. Diese Unterschiede könnten helfen, um die Subtyp-spezifische Pathogenese besser zu verstehen und somit die Entwicklung von neuen, individuellen und zielgerichteten Therapien zu unterstützen.

6 Summary

The jIIM form a heterogeneous group of rare systemic autoimmune diseases in childhood and should be distinguished as a separate entity from the adult forms. The clinical picture is characterized by muscle weakness, chronic skeletal muscle inflammation, and a variety of associated extramuscular symptoms. Despite a tremendous development in recent years the exact pathomechanism remains elusive and there is no international consensus in the classification of the disease, impacting the prognosis and therapy of the patients.

In this study, skeletal muscle biopsies from 15 patients with jIIM (median age 8 years, range 3 - 17 years, 73 % female) and seven age-matched control biopsies were examined using standard staining, IHC, and TEM. Detailed clinical and laboratory data were collected retrospectively. Most patients presented proximal muscle weakness and skin symptoms. DM was diagnosed in 9/15, ASyS in 4/15, and OM in 2/15 patients. The analysis of muscle biopsies showed immigration of inflammatory cells, increased necrotic and regenerative processes, and upregulation of MHC 1 and 2. Morphological key features included COX-deficient fibers as a distinct pathology of DM and perimysial deposition of ALP in Anti-Jo1-ASyS. In addition, those subtypes showed sarcolemmal upregulation of the IFN surrogate marker MxA, capillary c5b-9 depositions, loss of endomysial capillaries and endothelial tubuloreticular inclusions in TEM. None of these specific findings could be detected in the biopsies of Anti-PL7-ASyS or OM.

Detailed clinical and morphological examination of IIM may be helpful to characterize the different jIIM subtypes. These differences may help to better understand subtype-specific pathogenesis and thus aid in the development of novel individualized and targeted therapies.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C.....	Grad Celcius
µm.	Mikrometer
µl.	Mikroliter
A.....	Alter bei Biopsie in Jahren
Abb.....	Abbildung
ACR.....	American College of Rheumatology
aDM.....	adulte Dermatomyositis
AG.....	Aktiengesellschaft
aIIM.....	adulte idiopathisch inflammatorische Myopathien
AK.....	Autoantikörper
ALP.....	Alkalische Phosphatase
ANA.....	Antinukleäre Antikörper
Antisynthetase.....	Aminoacyl-transfer-RNA-Synthetase
ASyS.....	Antisynthetasesyndrom
c5b-9.....	Komplementkomplex c5b-9
ca.	circa
CD.....	Cluster of Differentiation
CF.....	Cystische Fibrose
CK.....	Kreatinkinase
cm ³	Kubikcentimeter
COX.....	Cytochrom-C-Oxidase
D.....	Diagnose
DGN.....	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DM.....	Dermatomyositis
DNS.....	Desoxyribonukleinsäure
dsDNS-AK.....	Doppelstrang-DNS-Antikörper
EM.....	Elektronenmikroskopie
EMG.....	Elektromyografie

ENMC	European Neuromuscular Centre
et al.	et alia
etc.	et cetera
EULAR.....	European League against Rheumatism
g.....	Gramm
G.....	Geschlecht
GOT.....	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h.....	..Stunde/n
HE.....	Hämalaun-Eosin
HLA.....	Humanes Leukozytenantigen
HMGCR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
JAK.....	Januskinase
JIA	juvenile idiopathische Arthritis
IBM	Einschlusskörperchenmyositis
IFN	Interferon
IFN1	Interferon Typ 1
IHC	Immunhistochemie
IIM.....	idiopathisch inflammatorischen Myopathien
IL	Interleukin
ILD	interstitielle Lungenerkrankung
IMNM.....	immunvermittelte nekrotisierende Myopathie
ISG	Interferon-stimulated-gene
iv.....	intravenös
IVIg	intravenöse Immunglobuline
jDM	juvenile Dermatomyositis
jIIM.....	juvenile idiopathisch inflammatorischen Myopathien
K.....	Kontrolle
KWT	Kruskall-Wallis-Test

L	Liter
LC3.....	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LDH.....	Laktatdehydrogenase
LJ.....	Lebensjahr/e
m.....	männlich
M.	Musculus
mg.....	Milligramm
min.....	Minute/n
mind.....	mindestens
ml.....	..Milliliter
MAA.....	Myositis-assozierte-Antikörper
MD	Musculus deltoideus
MHC.....	Major Histocompatibility Complex
MHCD.....	Developmental Myosin heavy chain
MQF	Musculus quadriceps femoris
MRT	Magnetresonanztomografie
MSA	Myositis-spezifische-Antikörper
MxA	Myxovirus Resistance Protein A
n.....	..Stichprobengröße
n.a.nicht analysiert
OM	Overlapmyositis
OT.....	Objektträger
OXPPOS.....	oxidative Phosphorylierung
P.....	Patient*in
POV.....	punched-out-vacuoles
RT.....	Raumtemperatur
S.....	Seite
SDH.....	Succinatdehydrogenase
Sec.Sekunde/n

Sm-AkSmith-Antikörper
 SLE systemischer Lupus erythematoses
 SRP Signal Recognition Particle
 SSc Systemische Sklerose
 Tab Tabelle
 TEMTransmissionselektronenmikroskopie
 TNF Tumornekrosefaktor
 TRE tubuloretikuläre Einschlüsse der Endothelzellen
 TRS Tröndle Restlichtverstärkersysteme
 u.a. unter anderem
 v.a.vor allem
 VASVisuelle Analogskala
 VEGFVascular endothelial growth factor
 w weiblich
 Wo Wochen
 z.B.zum Beispiel

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Die Historische Entwicklung der IIM Klassifikation	3
Abbildung 2: Klinische Manifestationen von jIIM Subtypen (A-D)	9
Abbildung 3: Die Skelettmuskelbiopsie – der Normalbefund versus Pathologie	16
Abbildung 4: Die medikamentöse Therapie der IIM	18
Abbildung 5: Altersverteilung der jIIM Subtypen in Jahren im Vergleich zu den Kontrollen.....	20
Abbildung 6: Hämalaun-Eosin gefärbte Kryostatschnitte der gesunden Skelettmuskulatur im Vergleich zu jIIM	24
Abbildung 7: COX-SDH-gefärbte Kryostatschnitte der gesunden Skelettmuskulatur im Vergleich zu jIIM	25
Abbildung 8: Alkalische Phosphatase (ALP) gefärbte Kryostatschnitte der gesunden Skelettmuskulatur im Vergleich zu jIIM	26
Abbildung. 9: Gomori-Trichom gefärbte Kryostatschnitte der gesunden Skelettmuskulatur im Vergleich zu jIIM	26
Abbildung 10: Immunhistochemisch gefärbte Kryostatschnitte der gesunden Skelettmuskulatur (A, C, E, G) im Vergleich zu jIIM	31
Abbildung 11: Ultrastrukturelle Morphologie eines regelhaften Skelettmuskels (K5) .	34
Abbildung 12: Anteil von skelettmuskulären Symptomen (dunkelgrün) und Hauterscheinungen (hellgrün) bei Patient*innen mit jIIM	36
Abbildung 13: Hauterscheinungen einer Patientin (P5) mit jDM.....	37
Abbildung 14: Begleitsymptome bei Patient*innen mit jIIM.....	38
Abbildung 15: Prozentualer Anteil der extramuskulären Symptome (hellgelb) und Komorbiditäten (dunkelgelb) bei Patient*innen mit jIIM.....	39
Abbildung 16: Violin plot zur Darstellung der Serum-Kreatinkinase (CK) bei jIIM im Vergleich zur Kontrollgruppe	40

Abbildung 17: MRT der Oberschenkelmuskulatur in T1 Sequenz einer Patientin (P4) mit NXP-2-positiver jDM.....	41
Abbildung 18: Ausgeprägte histomorphologische Veränderungen mit hohem VAS score bei jIIM im Vergleich zur Kontrollgruppe	54
Abbildung 19: Hämalan-Eosin und Gomori-Trichom-Färbungen bei jIIM (A - F) im Vergleich zu Kontrollen (K4; G+H)	56
Abbildung 20: Darstellung von inflammatorischen Zellen bei jIIM im Vergleich zur Kontrolle.....	57
Abbildung 21: Perimysiale Hochregulation von ALP in Biopsien von Patient*innen mit Anti-Jo-1-ASyS.....	58
Abbildung 22: Lichtmikroskopische und ultrastrukturelle Darstellung der mitochondrialen Pathologie bei jIIM	59
Abbildung 23: Scatter-Plots zur Bewertung der Standard- und Enzymfärbungen der jIIM-Subgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	62
Abbildung 24: Muskelfaserdestruktion und Regeneration bei jIIM (P4: B+D, P14: F) im Vergleich zur Kontrolle (K4: A, C, E).....	63
Abbildung 25: Ultrastrukturelle Strukturstörungen	64
Abbildung 26: Sarkolemmale Expression von MHC I, MHC II und Komplement (c5b-9) bei jIIM im Vergleich zu Kontrolle (K4: A, C, E).....	65
Abbildung 27: Expression autophagischer Marker p62 und LC3 bei jIIM im Vergleich zu einer Kontrolle.....	66
Abbildung 28: Vaskulopathie und Hypoxie bei jIIM im Vergleich zu einer Kontrolle	67
Abbildung 29: MxA-Expression und Tubuloretikuläre Einschlüsse (TRE)	69
Abbildung 30: Darstellung der Immunhistochemischen Färbungen bei jIIM-Subgruppen und Kontrollen.....	73
Abbildung 31: Ultrastrukturelle Pathologien der jIIM und Kontrollgruppe	74

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeit von IIM-Subtypen im Kindes- und Erwachsenenalter.....	2
Tabelle 2: Überblick über die Klinik von adulten und juvenilen Myopathien.....	6
Tabelle 3: Extramuskuläre klinische Manifestationen und assoziierte MSA	8
Tabelle 4: MSA in adulter und juveniler DM	11
Tabelle 5: Pathologische Veränderungen in der Muskelbiopsie von inflammatorischen Myopathien.....	14
Tabelle 6: Verdachtsdiagnosen und Biopsiecharakteristika der Kontrollgruppe.....	21
Tabelle 7: Primärantikörper IHC.....	27
Tabelle 8: Mustertabelle zum Scoring der Pathologie von Standardfärbungen, Enzymhistochemie und Immunhistochemie (modifiziert nach Wedderburn und Varsani)	32
Tabelle 9: Mustertabellen zum Scoring der ultrastrukturellen Pathologie.....	34
Tabelle 10: Klinische Befunde bei jIIM.....	43
Tabelle 11: Übersicht der apparativen Diagnostik bei jIIM.....	48
Tabelle 12: Laborparameter und Analyse der Antikörper bei jIIM	53
Tabelle 13: Paarweise Untersuchung mithilfe des Dunn-Tests	55
Tabelle 14: Morphologische Untersuchungen von jIIM anhand von Standard- und Enzymfärbungen	60
Tabelle 15: Morphologische Untersuchungen der Kontrollgruppe anhand von Standard- und Enzymfärbungen	61
Tabelle 16: Morphologische Untersuchungen der jIIM mit IHC-Färbungen	70
Tabelle 17: Ultrastrukturelle Analyse der jIIM.....	71
Tabelle 18: Ultrastrukturelle Analyse der Kontrollgruppe	72
Tabelle 19: Morphologische Untersuchungen bei der Kontrollgruppe mit IHC-Färbungen	72

Tabelle 20: Geräte	103
Tabelle 21: Software	103
Tabelle 22: Verbrauchsmaterial	104
Tabelle 23: Verwendete IHC-Antikörper.....	112

10 Anhang

10.1 Geräte, Software und Verbrauchsmaterial

Tab. 20: Geräte	
Abzug	Köttermann GmbH, Uetze
Atenschutz mit Aktivkohlefilter	3M, Saint Paul, Minnesota, Vereinigte Staaten
Elektronenmikroskop EM 109	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Exsikkator	Glaswerk Wertheim, Wertheim
Feuchte Kammer	Von Keutz – Labortechnik, Reiskirchen
Heizplatte OTS 40	Medite Medical GmbH, Burgdorf
Kamera Nikon Digital Sight DS-Fi1	Nikon Corporation, Minato, Tokio, Japan
Kamera Slow-Scan CCD-Camera for TEM 2K-Wide Angle	TRS/Tröndle Restlichtverstärkersysteme, Moorenweis
Kryostat Leica CM1950	Leica Camera AG, Wetzlar
Leica EM AC20 Kontrastierungsautomat	Leica Camera AG, Wetzlar
Leica EM TP Entwässerungsautomat (inkl. Probenhalterung, Probenkörbchen, Deckel, Metallhalter, Belegungsplan)	Leica Camera AG, Wetzlar
Magnetrührer M21/1 mit Ceran Heizplatte	Framo Gerätetechnik
Milli-Q Direct 8 Wasseraufbereitungs-system	Merck KGaA, Darmstadt
Nadel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Nikon Eclipse 80i Mikroskop	Nikon Corporation, Minato, Tokio, Japan
Pinzette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pipetten (1-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Probenschüttler DSG Titertek	Flow Laboratories
Ultramikrotom Ultracut E	Reichert-Jung (Leica Camera AG, Wetzlar)
Ultratrim	Reichert-Jung (Leica Camera AG, Wetzlar)
Ventana BenchMark XT	Ventana Medical Systems Inc. (F. Hoffmann- La Roche AG, Basel, Schweiz)
Wärmeschrank 37°C	Medite Medical GmbH, Burgdorf
Wärmeschrank 60°C Modell 100-800	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach

Tab. 21: Software	
BioRender.com	Erstellung von Abbildungen
End Note X9.3.1	Zitierprogramm
GIMP 2.10.22	Fotobearbeitung

Graph Pad Prism 9.2.0.332	Graphische Darstellungen
Image SP (advanced)	Fotoprogramm für ultrastrukturelle digitale Bildaufnahmen
Microsoft Office 2021 Excel PowerPoint Word	Tabellenprogramm Erstellen von Abbildungen Textverarbeitungsprogramm
RStudio Desktop 4.1.2 (2021.11.01)	Statistische Auswertung

Tab. 22: Verbrauchsmaterial

Aceton (Art. Nr.: 5025.3)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agar 100 Resin Kit (Art. Nr.: R1031) - BDMA (N, N-Dimethylbenzylamin) - DDSA (Dodeceny succinic anhydride) - MNA (Methylnadicanhydride) - Agar 100 Resin	Agar Scientific Ltd, Stansted, Essex, Vereinigtes Königreich
Aqua bidest.	Hergestellt durch Milli-Q Direct 8 (siehe Geräte)
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen; Milli-Q Direct 8
Aquatex (Art. Nr.: 1.08562.0050)	Merck KGaA, Darmstadt
Azur A (Art. Nr.: A6270-10G)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
3 % Bleicitrat (Art. Nr.: 16705530)	Leica Camera AG, Wetzlar
Bluing Reagent (Art. Nr.: 05266769001)	Roche Diagnostics (Schweiz) AG (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz)
Caps	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Chromotrop 2R (Art. Nr.: C3143-25G)	Merck KGaA, Darmstadt
Cytochrom-C (Art. Nr.: C-2506)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Cytoseal XYL -83124 (Art. Nr.: 12502736)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Art. Nr.: D- 5637)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Deckgläschen (24 x 55 mm)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

5,5-diethylbarbiturate C-IV Natrium Barbital (Art. Nr.: B0500-100G)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
di-Natriumhydrogenphosphat (Art. Nr.: 1.065860.500)	Merck KGaA, Darmstadt
di-Natriumtetraborat-Decahydrat (Art. Nr.: T880.1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Di-Phosphorus-pentoxid (Art. Nr.: 1.00570.0500)	Merck KGaA, Darmstadt
Eosin AG (Art. Nr.: 1B-419)	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster
Essigsäure (Art. Nr.: 1.00063.1011)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (Art. Nr.: 32205)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Fast Blue RR Salz (Art. Nr.: F0500-25G)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Fast Green (Art. Nr.: 1.04022.0025)	Merck KGaA, Darmstadt
Filterpapier	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
4 % Formol (Art. Nr.: P087.3)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
25 % Glutaraldehydlösung (Art. Nr.: 1.04239.1000)	Merck KGaA, Darmstadt
Harris Hämatoxylin (Art. Nr.: 2E 056)	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster
Hematoxylin (Art. Nr.: 05266726001)	Roche Diagnostics (Schweiz) AG (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz)
Katalase 11.000 U/mg (Art. Nr.: 26910.01)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Korkplättchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kupfer-Grits	Plano GmbH, Wetzlar
Küvetten	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mayer's Hämalaun/ Hämatoxylin (C.I.75290, Art. Nr.: 1.04302.0100)	Merck KGaA, Darmstadt
Menadion (Art. Nr.: M5625-25G)	Merck KGaA, Darmstadt
2-Methylbutan (Art. Nr.: 1.06056.1000)	Merck KGaA, Darmstadt
Methylenblau (Art. Nr.: 159270)	Merck KGaA, Darmstadt
1-Naphthylphosphatmononatriumsalz- monohydrat (Art. Nr.: N7000-5G)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

Natriumhydrogenphosphat Monohydrat (Art. Nr.: 1.063460.500)	Merck KGaA, Darmstadt
NBT (Nitrobluetetrazoliumchlorid, Art. Nr.: 30550.03)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Nitrilhandschuhe Vasco	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Papiertücher	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Parafilm M Verschlussfolie	Parafilm, Oshkosh, WI, USA
Petrischale	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Probenfischchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Propylenoxid (Art. Nr.: 82320)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Rasierklingen	Wilkinson Sword GmbH, High Wycombe, Vereinigtes Königreich
Roticlear (Art. Nr.: A538.5)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Roti-Mount (Art. Nr.: HP68.2)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Saccharose (Art. Nr.: 4621.1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Silikonförmchen für TEM	Plano GmbH, Wetzlar
Succinylsäure-dinatrium (Bernsteinsäure, Art. Nr.: 14972.02)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Super Frost Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Testkapseln für Agar	Agar Scientific Ltd, Stansted, Essex, Vereinigtes Königreich
Tissue-Tek (Art. Nr.: 4583)	Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande
Trichter	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trisaminomethan (Art. Nr.: 37180.02)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tropfpipetten/Pasteurpipetten	BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes, Vereinigte Staaten
UltraView Universal DAB Detection Kit (Art. Nr.: 05269806001)	Ventana Medical Systems Inc. (F. Hoffmann- La Roche AG, Basel, Schweiz)
0,5 %- Uranylacetat (Art. Nr.: 16705695)	Science Services GmbH, München
Wolframatophosphorsäure (Art. Nr.: 1.00583.0250)	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol (Art. Nr.: 9713.2)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

10.2 Zusammensetzung der Gebrauchslösungen

COX-Färbung

COX-Stammlösung (für 10 ml):

- 10 ml Natriumphosphatpuffer pH 7,4
 - + 125 mg Katalase
 - + 5 mg DAB
 - + 10 mg Cytochrom C
 - + 750 mg Saccharose
- gut mischen und in 1 ml und 2 ml Caps aliquotieren

Pro OT ca. 300-400 µl berechnen

Natriumphosphatpuffer pH 7,4 für COX-Färbung:

- 2,76 g NaH_2PO_4 in 90 ml Aqua dest. lösen
- mit 2 N NaOH auf pH 7,4 stellen und auf 100 ml auffüllen

SDH-Färbung

Trispuffer 0,2 M:

2,42 g Trisaminomethan in 90 ml Aqua dest. lösen mit 2 N HCl-Lösung auf pH 7,2 einstellen und auf 100 ml auffüllen.

Succinatlösung:

6,5 g Succinylsäure-dinatrium in 40 ml Aqua dest. lösen.

NBT- Lösung:

100 mg NBT (Nitrobluetetrazolium, +4°C) in 100 ml Aqua dest. lösen.

400 ml Stammlösung:

- 100 ml NBT-Lösung
 - 100 ml 0,2 M Trispuffer pH 7,2 zugeben
 - 160 ml Aqua dest. zugeben
 - 40 ml Succinat zugeben.
- Gut Rühren und in 10x20 ml und 5x40 ml Portionen einfrieren.

Gebrauchslösung:

- SDH Stammlösung über Nacht im Kühlschrank auftauen lassen.
- 20 mg Menadion in 20 ml Stammlösung lösen (40 mg für 40 ml Stammlösung)
- Filterieren

ALP-Färbung

Vorratslösung 0,1 M Natrium-Barbital-Lösung:

4,12 g 5,5-diethylbarbiturate C-IV
+ 200,0 ml Aqua dest. (Lagerung 4°C)

Inkubationslösung:

20 ml 0,1 M Natrium-Barbital-Lösung
+ 40 mg 1-Naphtyl phosphate monosodium salt
+ 20 mg Fast Blue Salz
→ auf pH 9,2 einstellen und filtrieren

Gomori-Trichom-Färbung

Gomori Trichromlösung

1,2 g Chromotrop 2R
+ 0,6 g Fast Green
+ 1,2 g Wolframato-phosphorsäure
+ 200 ml Aqua dest.
+ 2 ml 100 % - Essigsäure

0,2 % - Essigsäure

1 ml 100 % - Essigsäure auf 500 ml Aqua dest.

Richardson-Lösung

Lösung A: 1 % Azur A → 1 g auf 100 ml Aqua dest. lösen (ca. 30 min rühren)

Lösung B: 1 % Methyleneblau → 1 g di-Natriumtetraborat-decahydrat in 100 ml

Aqua dest. lösen

→ 1 g Methyleneblau in 100 ml Natriumtetraborat

Lösen (ca. 30 min rühren)

Lösung A + B zusammengeben und filtrieren.

Die Lösung muss ca. 2 Wochen reifen, bis sie verwendet werden kann. Wenn die Lösung reif ist, erkennt man einen goldenen Rand bei der Inkubation der Lösung

Fixierung Kryoschnitte für EM

Phosphatpuffer für Glutaraldehyd-Lösung:

Anleitung für 1 L 0,4 mol Phosphatpuffer:

7,175 g – $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

+ 49,4 g – Na₂HPO₄

+ mit 1 L Aqua Bidest. auf Rührer mit 60°C lösen

0,1 mol Phosphatpuffer:

1,8 g - NaH₂PO₄ x H₂O

+ 12,35 g - Na₂HPO₄

mit 1 L Aqua Bidest. auf Rührer mit 60°C lösen

6 % Glutaraldehyd-Lösung für Muskelproben:

120 ml 25 % Glutaraldehyd

93,8 ml 0,4 mol Phosphatpuffer auf 500 ml mit Aqua Bidest. auffüllen

Entwässerung

1 % - Osmiumlösung zur Fixierung und Kontrastanfärbung bei EM-Proben

Es ist wichtig, dass während der Arbeit mit Osmiumkristallen ein Atemschutz getragen oder unter einem Abzug gearbeitet wird, da es hochtoxisch ist.

500 mg Osmiumtetroxid + 25 ml Aqua Bidest.

10.3 Färbeprotokolle

HE

1. Kryoschnitte 10-15 min auftauen lassen und dann in Aqua dest. spülen.
2. 5 Minuten in Mayer`s Hämalaun färben.
3. 5 Minuten in sauberem Leitungswasser bläuen.
4. In Aqua dest. kurz abspülen.
5. 2-3 Minuten in Eosin färben.
6. In aufsteigender Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %) abspülen, bis es klar von den Schnitten läuft.
7. Abspülen in Xylol.
8. Zweites Abspülen in einem weiteren Gefäß mit Xylol. Dort können die Schnitte eine längere Zeit verweilen oder kurz nach der Färbung eingedeckt werden.

COX-SDH Doppelfärbung für Kryoschnitte

- COX:

1. 6 µm-Kryoschnitte bei RT und aliquotierte Caps mit Stammlösung im Kühlschrank 1-2 Stunden trocknen/auftauen lassen
2. Feuchte Kammer vorbereiten
3. OT in feuchte Kammer geben und Schnitte mit Stammlösung bedecken
4. Über Nacht in der feuchten Kammer bei RT inkubieren
5. 3x spülen in Aqua dest.
6. SDH-Färbung anschließen

- SDH

1. Nach Aqua dest. spülen, 40 min bei 37°C in Gebrauchslösung inkubieren (mikroskopische Kontrolle)
2. Reste abschütten und OT für mindestens 60 min in 4 % Formol stellen

3. Zweimal Leitungswasser abspülen
4. Zweimal mit Aqua dest. abspülen.
5. Mit Aquatex eindecken

Ergebnis: wenn Enzym vorhanden, Muskelfaser dunkelbraun. Bei COX-Defizienz und vorhandener SDH erscheinen die Muskelfasern blau.

ALP für Muskelkryoschnitte

1. 6 µm-Kryoschnitte 15 min trocknen lassen
2. 75 min bei Raumtemperatur in Inkubationslösung stellen (mikroskopische Kontrolle)
3. 3x spülen mit Aqua dest.
4. 10 min in 1 % Essigsäure inkubieren
5. 3x spülen mit Aqua dest.
6. Mind. 1 h lufttrocknen oder über Nacht
7. Ca. 10 min in Aqua dest. stellen
8. Mit Aquatex eindecken

Ergebnis: Die Enzymaktivität ist als feine schwarze Ablagerung zu erkennen.

Gomori-Trichom

1. Kryoschnitte bei RT ca. 15 min trocknen lassen
2. 5-8 min Harris Hämatoxylin auf OT geben
3. Spülen in Aqua dest
4. 20-60 min Gomoris Trichromlösung
5. Spülen in Aqua dest.
6. 2x spülen in 0,2 %- Essigsäure
7. Spülen in Aqua dest.
8. Durch die aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol weiterführen
9. Eindecken mit Cytoseal

- Mikroskopische Kontrolle während der Inkubation in Gomoris Trichromlösung
- Gomoris Trichromlösung ca. 10-mal benutzen, dann frische Lösung benutzen

Ergebnis: Kerne → blaviolett; Ragged Red Fibres → leuchtend rot;

Muskelfaser → blaugrün bis dunkelgrün; Bindegewebe → hellgrün

Richardson für Semidünnschnitte

- | | |
|---|------------|
| 1. Objektträger auf der Heizplatte bei 58° C vorwärmen | ca. 10 min |
| 2. Richardson-Lösung | 6-7 min |
| 3. Mit Aqua dest. abspülen | |
| 4. Schnitte vor dem Eindecken auf der Heizplatte trocknen | ca. 1 h |
| 5. Roticlear | 5-10 min |
| 6. Mit Rotimount eindecken | |

Färbeprotokoll IHC an Ventana BenchMark

Bis auf die MHCD-Färbung wurden die Kryoschnitte vor der Färbung in Aceton fixiert.

1. Objektträger 10 min bei RT trocknen
2. 10 min Aceton-Fixierung
3. 10 min bei RT trocknen

Protokoll Ventana BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul mit UltraView Universal DAB Detection Kit

1. EZ Prep auswählen
2. Getimte Schritte starten
3. Mischer aus
4. RB Vol. ausgleichen
5. Spülen mit Reaktionspuffer
6. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
7. Coverslip auftragen
8. Mischer an
9. SSC Wash auswählen
10. Synchronisieren der Prozeduren
11. Aufheizen des OT auf 37°C und für 4 min inkubieren
12. Spülen mit Reaktionspuffer
13. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
14. Coverslip auftragen
15. Aufheizen des OT auf gewünschte Temperatur und für 4 min Inkubieren (individuell anwählbar)
16. Spülen mit Reaktionspuffer
17. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
18. Coverslip auftragen
19. 1 Tropfen (PREP KIT 61) (Antikörper), und für (gewünschte Zeit) inkubieren (individuell anwählbar)
20. Spülen mit Reaktionspuffer
21. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
22. Coverslip auftragen
23. Aufheizen des OT auf 37°C und für 4 min inkubieren
24. Spülen mit Reaktionspuffer
25. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
26. 1 Tropfen UV HRP UNIV MULT auftragen, Coverslip auftragen, und für 8 min inkubieren
27. Spülen mit Reaktionspuffer
28. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
29. Coverslip auftragen
30. Spülen mit Reaktionspuffer
31. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
32. 1 Tropfen UV DAB und einen Tropfen UV DAB H202 auftragen, LCS auftragen und für 8 min inkubieren
33. Spülen mit Reaktionspuffer
34. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
35. 1 Tropfen UV COPPER auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 min inkubieren
36. Spülen mit Reaktionspuffer
37. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
38. 1 Tropfen von (HEMATOXYLIN) (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für (4 Minuten) inkubieren.
39. Spülen mit Reaktionspuffer
40. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

41. Coverslip auftragen
42. Spülen mit Reaktionspuffer
43. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
44. 1 Tropfen von (BLUING REAGENT) (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für (4 Minuten) inkubieren.
45. Spülen mit Reaktionspuffer
46. Coverslip auftragen
47. Objektträger-Heizung ausschalten
48. Optionaler Waschvorgang auswählen
49. SSC Wash auswählen
50. Getimte Schritte starten
51. Spülen mit Reaktionspuffer

Ein Tropfen entspricht einer Reagenziengabe. Für die individuellen Färbungen ist vor Start des Protokolls die Funktion (Nicht-Paraffin) für Kryoschnitte, die Inkubationstemperatur (siehe Tabelle), der Primärantikörper, die Inkubationszeit (siehe Tabelle) und die Gegenfärbung (Hematoxylin) mit Nach-Gegenfärbung (Bluing Reagent) auszuwählen.

Tab. 23: Verwendete IHC-Antikörper			
Antikörper	Inkubations- temperatur	Inkubationszeit	Besonderheit
MHC I	37°C	32 min	
MHC II	37°C	32 min	
c5b-9	42°C	32 min	
CD 3 vor 08/2017	RT	60 min	
CD 3 nach 08/2017	RT	60 min	
CD 8	RT	52 min	
CD 20	RT	60 min	Ultra Wash (Hintergrundreduktion)
CD 68	37°C	44 min	
CD 56	RT	60 min	
MHCD	37°C	32 min	Ohne Acetonfixierung
Myotilin	RT	60 min	
Mx1/2/3 (MxA)	37°C	32 min	
p62	37°C	40 min	
LC 3	RT	60 min	
CD 31	37°C	44 min	
VEGF	42°C	60 min	

RT= Raumtemperatur/Objektträgerheizung aus

Herstellung Agar mit Agar 100 Resin Kit

Agar 100 Resin	48 g
+ DDSA	32 g
+ MNA	20 g

1. Agar für mindestens 20 min rühren lassen.
2. Anschließend in vier Gläschen jeweils 20 g abwiegen.
3. Bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahren.

Bei Bedarf kann der Agar aufgetaut werden, allerdings muss dann noch 0,3 g BDMA dazugegeben werden. Die restlichen 20 g Agar werden mit 0,3 g BDMA versetzt und auf Falconröhrchen aufgeteilt und ebenfalls bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Entwässerung am Leica EM TP Gerät

1. Die zugeschnittenen Proben sollten rechtzeitig aus dem Kühlschrank genommen und der 0,1 mol Phosphatpuffer ggf. ausgetauscht werden.
2. Bis zur weiteren Verwendung die Proben auf den Schüttler stellen.
3. Den Entwässerungsautomaten nach Anleitung mit Ethanol bestücken (bei 3-4 Proben 10 ml Volumen, 5-8 Proben 12 ml Volumen).
4. Unter Atemschutz die 1 % Osmium mit 0,1 mol Phosphatpuffer im Verhältnis 1:1 lösen und in die dafür vorgesehene Küvette geben.
5. Probelauf des Geräts mit leeren Küvetten starten, um den Sitz zu kontrollieren.
6. Küvetten nun füllen und nochmals den Sitz kontrollieren.
7. Anschließend je nach Probenbefüllung die benötigte Menge Agar auftauen lassen.
8. Start von *Entwässerungsprogramm 2* mit Einhängen der Proben.
9. Nach ca. 2 h wird das Programm schneller und das Propylenoxid sollte reingestellt werden.
10. Währenddessen sollten die Agargläschen mit einem Probenfischchen auf den Rührer gestellt werden.
11. Je Gläschen sollte 0,3 g BDMA mit einer Tropfpipette abgewogen werden.
12. Nun wird das BDMA zu dem Agar gegeben und für mindestens 20 min gut verrührt (dabei entsteht ein Farbumschlag von gelb zu bernsteinfarben).
13. Die entsprechenden Einbettformen je nach Probennummer beschriften und sorgfältig vor der Befüllung entstauben, damit möglichst keine Luftblasen entstehen.
14. Über Nacht die Testkapseln bei 60°C im Ofen aushärten lassen und am nächsten Tag überprüfen.
15. Der Entwässerungsautomat piept, sobald sich die Proben im Propylenoxid-Agar-Gemisch befinden (Programm ist beendet).
16. Die Proben können nun entnommen, mit einem Papiertuch abgewischt und in die Küvetten mit Agar gestellt werden (dieser sollte die Proben gut bedecken).
17. Den Entwässerungsautomaten nach der Benutzung reinigen. Die erste Küvette und die Alkohole können in den organischen Abfall gegeben werden. Das Osmiumgemisch und die folgenden Küvetten in den Osmiumabfall geben. Die Küvetten in 100 % Ethanol einlegen und vor Wiedergebrauch spülen.

Entwässerungsprogramm 2 Leica EM TP

1. 10 min 0,1 mol Phosphatpuffer

2. 150 min 1 % Osmium 1:1 verdünnt mit 0,1 mol Phosphatpuffer
3. 10 min 0,1 mol Phosphatpuffer
4. 10 min 0,1 mol Phosphatpuffer
5. 10 min 25 % Ethanol
6. 10 min 35 % Ethanol
7. 10 min 50 % Ethanol
8. 10 min 70 % Ethanol
9. 10 min 75 % Ethanol
10. 10 min 80 % Ethanol
11. 10 min 100 % Ethanol
12. 20 min 100 % Ethanol
13. 20 min 100 % Ethanol
14. 20 min 100 % Propylenoxid
15. 20 min Resin-Agar 1:1 verdünnt mit 100 % Propylenoxid
16. 60 min fertiges Resin-Agar

Epon-Einbettung

1. Proben aus dem Agar nehmen und abtropfen lassen.
2. Mithilfe einer Pinzette die Proben entsprechend der Längs- oder Querrichtung in die gefüllten Silikonförmchen legen und absinken lassen. Die dazugehörige Probennummer mit einbetten. Mithilfe einer Nadel die Proben ausrichten. Möglichst keine Luftblasen erzeugen.
3. Anschließend mit einer Tropfpipette die Formen auffüllen, bis die Proben ausreichend bedeckt sind und sich das Agar leicht nach oben wölbt.
4. Aushärten der eingebetteten Blöcke bei 60°C im Wärmeschrank für zwei bis drei Tage. Zur Sicherheit sollten Kontrollproben mitgegossen werden, die auf Festigkeit geprüft werden können.
5. Bei ausreichender Härte können die Blöcke aus dem 60°C Wärmeschrank genommen werden und auskühlen. Die Formen können für die weitere Verwendung mit Alkohol gereinigt werden.
6. Die fertigen Blöcke können nun nach Probennummer einsortiert und gegebenenfalls getrimmt werden.

Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Zur Kontrastierung wurde das Leica EM AC20 mit dem Programm 3 verwendet.

- | | |
|---|--------|
| 1. Benetzen der Kupfer-Grits mit Aqua dest. | 30 sec |
| 2. Inkubation mit 0,5 % Uranylacetat | 40 min |
| 3. Waschen mit Aqua dest. | 3 min |
| 4. Inkubation mit 3 % Bleicitrat | 7 min |
| 5. Waschen mit Aqua dest. | 3 min |

11 Literaturverzeichnis

- Aguila, Lisbeth Aranbicia et al. (2014): Clinical and laboratory features of overlap syndromes of idiopathic inflammatory myopathies associated with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, or rheumatoid arthritis. In: *Clinical Rheumatology*, 33. Jg. (8), S. 1093-1098.
- Alhatou, Mohammed I. et al. (2004): Mitochondrial abnormalities in dermatomyositis: characteristic pattern of neuropathology. In: *The Histochemical Journal*, 35. Jg. (6), S. 615-619.
- Allenbach, Y. et al. (2017): Integrated classification of inflammatory myopathies. In: *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 43. Jg. (1), S. 62-81.
- Aouizerate, Jessie et al. (2018): Muscle ischaemia associated with NXP2 autoantibodies: a severe subtype of juvenile dermatomyositis. In: *Rheumatology*, 57. Jg. (5), S. 873-879.
- Aringer, M. (2019): EULAR/ACR classification criteria for SLE. In: *Semin Arthritis Rheum*, 49. Jg. (3s), S. S14-s17.
- Arndt, Verena et al. (2010): Chaperone-Assisted Selective Autophagy Is Essential for Muscle Maintenance. In: *Current Biology*, 20. Jg. (2), S. 143-148.
- Baechler, Emily C et al. (2006): Gene expression profiling in human autoimmunity. In: *Immunological reviews*, 210. Jg. (1), S. 120-137.
- Baechler, Emily C. et al. (2007): An Interferon Signature in the Peripheral Blood of Dermatomyositis Patients is Associated with Disease Activity. In: *Molecular Medicine*, 13. Jg. (1-2), S. 59-68.
- Baechler, Emily C./Bilgic, Hatice/Reed, Ann M. (2011): Type I interferon pathway in adult and juvenile dermatomyositis. In: *Arthritis Research & Therapy*, 13. Jg. (6), S. 249.
- Banker, Betty Q. (1975): Dermatomyositis of Childhood. In: *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 34. Jg. (1), S. 46-75.
- Barnabe, Cheryl et al. (2012): Prevalence of autoimmune inflammatory myopathy in the first nations population of Alberta, Canada. In: *Arthritis Care & Research*, 64. Jg. (11), S. 1715-1719.
- Baumann, Matthias et al. (2018): Pattern of myogenesis and vascular repair in early and advanced lesions of juvenile dermatomyositis. In: *Neuromuscular Disorders*, 28. Jg. (12), S. 973-985.
- Benveniste, O./Goebel, H. H./Stenzel, W. (2019): Biomarkers in Inflammatory Myopathies—An Expanded Definition. In: *Frontiers in Neurology*, 10. Jg. (554).
- Bernatsky, S. et al. (2009): Estimating the prevalence of polymyositis and dermatomyositis from administrative data: age, sex and regional differences. In: *Ann Rheum Dis*, 68. Jg. (7), S. 1192-1196.
- Betteridge, Z. et al. (2019): Frequency, mutual exclusivity and clinical associations of myositis autoantibodies in a combined European cohort of idiopathic inflammatory myopathy patients. In: *J Autoimmun*, 101. Jg., S. 48-55.
- Bitencourt, Nicole et al. (2020): Inflammatory myositis in systemic lupus erythematosus. In: *Lupus*, 29. Jg. (7), S. 776-781.
- Bohan, Anthony/Peter, James B (1975): Polymyositis and Dermatomyositis: (First of Two Parts). In: *New England Journal of Medicine*, 292. Jg. (7), S. 344-347.
- Bonroy, Carolien et al. (2022): Positioning of myositis-specific and associated autoantibody (MSA/MAA) testing in disease criteria and routine diagnostic work-up. In: *Journal of Translational Autoimmunity*, S. 100148.

- Bottai, Matteo et al. (2017): EULAR/ACR classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups: a methodology report. In: *RMD Open*, 3. Jg. (2), S. e000507.
- Bronner, I. M. et al. (2004): Polymyositis: an ongoing discussion about a disease entity. In: *Arch Neurol*, 61. Jg. (1), S. 132-135.
- Bronner, Irene M. et al. (2008): Tubuloreticular Structures in Different Types of Myositis: Implications for Pathogenesis. In: *Ultrastructural Pathology*, 32. Jg. (4), S. 123-126.
- Bucelli, Robert C./Pestronk, Alan (2018): Immune myopathies with perimysial pathology. In: *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 5. Jg. (2), S. e434.
- Buckley, Anne F./Bossen, Edward H. (2013): Skeletal Muscle Microvasculature in the Diagnosis of Neuromuscular Disease. In: *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 72. Jg. (10), S. 906-918.
- Carpenter, S. et al. (1976): The childhood type of dermatomyositis. In: *Neurology*, 26. Jg. (10), S. 952-952.
- Catalán, M/Selva-O'Callaghan, A/Grau, JM (2014): Diagnosis and classification of sporadic inclusion body myositis (sIBM). In: *Autoimmunity reviews*, 13. Jg. (4-5), S. 363-366.
- Cavagna et al. (2019): Influence of Antisynthetase Antibodies Specificities on Antisynthetase Syndrome Clinical Spectrum Time Course. In: *Journal of Clinical Medicine*, 8. Jg. (11), S. 2013.
- Cea, G. (2002): Reduced oxidative phosphorylation and proton efflux suggest reduced capillary blood supply in skeletal muscle of patients with dermatomyositis and polymyositis: a quantitative ³¹P-magnetic resonance spectroscopy and MRI study. In: *Brain*, 125. Jg. (7), S. 1635-1645.
- Cerbelli, Bruna et al. (2018): Anti-aminoacyl-tRNA synthetase-related myositis and dermatomyositis: clues for differential diagnosis on muscle biopsy. In: *Virchows Archiv*, 472. Jg. (3), S. 477-487.
- Crum-Cianflone, Nancy F. (2008): Bacterial, Fungal, Parasitic, and Viral Myositis. In: *Clinical Microbiology Reviews*, 21. Jg. (3), S. 473-494.
- Dalakas, Marinos C. (2015): Inflammatory Muscle Diseases. In: *New England Journal of Medicine*, 373. Jg. (4), S. 393-394.
- Dalakas, Marinos C./Irlbacher, K. (2016): Polymyositis, Dermatomyositis und Einschlusskörperchenmyositis. In: Kasper, D. L. et al. (Hrsg.): *Harrisons - Innere Medizin*. 19. Auflage, Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH.
- Damoiseaux, Jan et al. (2022): 256th ENMC International Workshop: Myositis specific and associated autoantibodies (MSA-ab): 8-10 October 2021. In: *Neuromuscular Disorders*.
- Damoiseaux, Jan et al. (2019): Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathies: Clinical associations and laboratory evaluation by mono- and multispecific immunoassays. In: *Autoimmunity reviews*, 18. Jg. (3), S. 293-305.
- De Bleecker, Jan L. et al. (2015): 205th ENMC International Workshop: Pathology diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies Part II 28–30 March 2014, Naarden, The Netherlands. In: *Neuromuscular Disorders*, 25. Jg. (3), S. 268-272.
- De Visser, M./Emslie-Smith, A. M./Engel, A. G. (1989): Early ultrastructural alterations in adult dermatomyositis. Capillary abnormalities precede other structural changes in muscle. In: *J Neurol Sci*, 94. Jg. (1-3), S. 181-192.

- Della Marina, Adela et al. (2021): Clinical Course, Myopathology and Challenge of Therapeutic Intervention in Pediatric Patients with Autoimmune-Mediated Necrotizing Myopathy. In: *Children*, 8. Jg. (9), S. 721.
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2022): Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie - Myositissyndrome. URL: <https://dgn.org/leitlinien/11-030-054-myositissyndrome/> (12.08.2022).
- Dobloug, Cecilie et al. (2015): Prevalence and clinical characteristics of adult polymyositis and dermatomyositis; data from a large and unselected Norwegian cohort. In: *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74. Jg. (8), S. 1551-1556.
- Dubowitz, Victor/Sewry, Caroline A./Oldfors, Anders (2013): *Muscle Biopsy - A Practical Approach*. 4. Auflage. Philadelphia: Saunders Elsevier Ltd.
- Dubowitz, Victor/Sewry, Caroline A./Oldfors, Anders (2021): *Muscle Biopsy - A Practical Approach*. 5. Auflage. Amsterdam: Elsevier.
- Ekholm, L. et al. (2016): Autoantibody Specificities and Type I Interferon Pathway Activation in Idiopathic Inflammatory Myopathies. In: *Scandinavian Journal of Immunology*, 84. Jg. (2), S. 100-109.
- Emslie-Smith, A. M./Engel, A. G. (1990): Microvascular changes in early and advanced dermatomyositis: a quantitative study. In: *Ann Neurol*, 27. Jg. (4), S. 343-356.
- Ferreira, Carlos R (2019): The burden of rare diseases. In: *American Journal of Medical Genetics Part A*, 179. Jg. (6), S. 885-892.
- Fischer, Norina et al. (2020): Sequestosome-1 (p62) expression reveals chaperone-assisted selective autophagy in immune-mediated necrotizing myopathies. In: *Brain Pathology*, 30. Jg. (2), S. 261-271.
- Franzi, Sara et al. (2013): Type I Interferons Inhibit Myotube Formation Independently of Upregulation of Interferon-Stimulated Gene 15. In: *PLoS ONE*, 8. Jg. (6), S. e65362.
- Fredi, Micaela/Cavazzana, Ilaria/Franceschini, Franco (2018): The clinico-serological spectrum of overlap myositis. In: *Current Opinion in Rheumatology*, 30. Jg. (6), S. 637-643.
- Furst, D. E. et al. (2012): Epidemiology of adult idiopathic inflammatory myopathies in a U.S. managed care plan. In: *Muscle Nerve*, 45. Jg. (5), S. 676-683.
- Gehlen, Walter/Delank, Heinz-Walter (2010): *Neurologie*. 12., vollst. überarb. Aufl. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Gitiaux, Cyril et al. (2015): Vasculopathy-related clinical and pathological features are associated with severe juvenile dermatomyositis. In: *Rheumatology*, S. kev359.
- Glaubitz, Stefanie/Zeng, Rachel/Schmidt, Jens (2020): New insights into the treatment of myositis. In: *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 12. Jg., S. 1759720X1988649.
- Greenberg, Steven A. et al. (2005): Interferon- α/β -mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis. In: *Annals of Neurology*, 57. Jg. (5), S. 664-678.
- Grundtman, Cecilia et al. (2008): Vascular endothelial growth factor is highly expressed in muscle tissue of patients with polymyositis and patients with dermatomyositis. In: *Arthritis & Rheumatism*, 58. Jg. (10), S. 3224-3238.
- Gunawardena, H./Betteridge, Z. E./McHugh, N. J. (2009): Myositis-specific autoantibodies: their clinical and pathogenic significance in disease expression. In: *Rheumatology*, 48. Jg. (6), S. 607-612.
- Gunawardena, H. et al. (2007): Clinical associations of autoantibodies to a p155/140 kDa doublet protein in juvenile dermatomyositis. In: *Rheumatology*, 47. Jg. (3), S. 324-328.

- Hedberg-Oldfors, Carola et al. (2022): Respiratory chain dysfunction in perifascicular muscle fibres in patients with dermatomyositis is associated with mitochondrial DNA depletion. In: *Neuropathology and Applied Neurobiology*.
- Hipp, Mark S./Park, Sae-Hun/Hartl, F. Ulrich (2014): Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. In: *Trends in Cell Biology*, 24. Jg. (9), S. 506-514.
- Hoogendijk, Jessica E. et al. (2004): 119th ENMC international workshop: Trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10–12 October 2003, Naarden, The Netherlands. In: *Neuromuscular Disorders*, 14. Jg. (5), S. 337-345.
- Hou, Cyrielle et al. (2021): From Diagnosis to Prognosis: Revisiting the Meaning of Muscle ISG15 Overexpression in Juvenile Inflammatory Myopathies. In: *Arthritis & Rheumatology*.
- Inoue, M. et al. (2019): Absence of sarcoplasmic myxovirus resistance protein A (MxA) expression in antisynthetase syndrome in a cohort of 194 cases. In: *Neuropathology and Applied Neurobiology*.
- Jiang, Yanyan et al. (2021): Mitochondrial morphology and MAVS-IFN1 signaling pathway in muscles of anti-MDA5 dermatomyositis. In: *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 8. Jg. (3), S. 677-686.
- Kassardjian, Charles D. et al. (2015): Clinical Features and Treatment Outcomes of Necrotizing Autoimmune Myopathy. In: *JAMA Neurology*, 72. Jg. (9), S. 996.
- Kishi, Takayuki et al. (2017): Association of Anti-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase Autoantibodies With DRB1*07:01 and Severe Myositis in Juvenile Myositis Patients. In: *Arthritis Care & Research*, 69. Jg. (7), S. 1088-1094.
- Ladislau, Leandro et al. (2018): JAK inhibitor improves type I interferon induced damage: proof of concept in dermatomyositis. In: *Brain*, 141. Jg. (6), S. 1609-1621.
- Lahoria, Rajat/Selcen, Duygu/Engel, Andrew G. (2016): Microvascular alterations and the role of complement in dermatomyositis. In: *Brain*, 139. Jg. (7), S. 1891-1903.
- Lucchini, Matteo et al. (2021): Anti-cN1A Antibodies Are Associated with More Severe Dysphagia in Sporadic Inclusion Body Myositis. In: *Cells*, 10. Jg. (5), S. 1146.
- Lüllmann-Rauch, Renate/Asan, Esther (2019): *Taschenlehrbuch - Histologie*. 6. vollständig überarbeitete. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Lundberg, Ingrid E. et al. (2021): Idiopathic inflammatory myopathies. In: *Nature Reviews Disease Primers*, 7. Jg. (1).
- Mammen, A. L. et al. (2020): 239th ENMC International Workshop: Classification of dermatomyositis, Amsterdam, the Netherlands, 14-16 December 2018. In: *Neuromuscul Disord*, 30. Jg. (1), S. 70-92.
- Mamyrova, Gulnara et al. (2007): Late-onset gastrointestinal pain in juvenile dermatomyositis as a manifestation of ischemic ulceration from chronic endarteropathy. In: *Arthritis & Rheumatism*, 57. Jg. (5), S. 881-884.
- Marhaug, G. et al. (2008): Age-dependent inhibition of ectopic calcification: a possible role for fetuin-A and osteopontin in patients with juvenile dermatomyositis with calcinosis. In: *Rheumatology*, 47. Jg. (7), S. 1031-1037.
- Mariampillai, Kubéraka et al. (2018): Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. In: *JAMA Neurology*, 75. Jg. (12), S. 1528.
- Mathian, Alexis et al. (2020): Reply. In: *Arthritis & Rheumatology*, 72. Jg. (1), S. 197-197.

- McCann, Liza J. et al. (2022): Juvenile dermatomyositis. Where are we now? In: *Clinical and experimental rheumatology*, 40. Jg. (2), S. 394-403.
- McHugh, Neil J./Tansley, Sarah L. (2018): Autoantibodies in myositis. In: *Nature Reviews Rheumatology*, 14. Jg. (5), S. 290-302.
- Melki, Isabelle et al. (2020): Circulating Interferon- α Measured With a Highly Sensitive Assay as a Biomarker for Juvenile Inflammatory Myositis Activity: Comment on the Article by Mathian et al. In: *Arthritis & Rheumatology*, 72. Jg. (1), S. 195-197.
- Mescam-Mancini, Lénaig et al. (2015): Anti-Jo-1 antibody-positive patients show a characteristic necrotizing perifascicular myositis. In: *Brain*, 138. Jg. (9), S. 2485-2492.
- Meyer, Alain et al. (2017): IFN- β -induced reactive oxygen species and mitochondrial damage contribute to muscle impairment and inflammation maintenance in dermatomyositis. In: *Acta Neuropathologica*, 134. Jg. (4), S. 655-666.
- Meyer, Alain et al. (2018): Mitochondria: An Organelle of Bacterial Origin Controlling Inflammation. In: *Frontiers in Immunology*, 9. Jg. (536).
- Meyer, Alain et al. (2015): Incidence and prevalence of inflammatory myopathies: a systematic review. In: *Rheumatology*, 54. Jg. (1), S. 50-63.
- Milisenda, Jose C et al. (2020): Accumulation of autophagosome cargo protein p62 is common in idiopathic inflammatory myopathies. In: *Clinical and experimental rheumatology*.
- Miro, O. (1998): Histological and biochemical assessment of mitochondrial function in dermatomyositis. In: *Rheumatology*, 37. Jg. (10), S. 1047-1053.
- Mohassel, P. et al. (2017): Anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase necrotizing myopathy masquerading as a muscular dystrophy in a child. In: *Muscle Nerve*, 56. Jg. (6), S. 1177-1181.
- Mozaffar, Tahseen/Pestronk, Alan (2000): Myopathy with anti-Jo-1 antibodies: pathology in perimysium and neighbouring muscle fibres. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 68. Jg. (4), S. 472-478.
- Naveen, R. et al. (2021): Characteristics and outcomes of overlap myositis: a comparative multigroup cohort study in adults from the MyoCite cohort. In: *Rheumatology International*, 41. Jg. (3), S. 551-563.
- Nolte, Janica (2022): Aufbau der Skelettmuskulatur. URL: <https://www.doccheck.com/de/detail/photos/41902-aufbau-der-skelettmuskulatur> (21.09.2022).
- Oddis, C. V. et al. (1990): Incidence of polymyositis-dermatomyositis: a 20-year study of hospital diagnosed cases in Allegheny County, PA 1963-1982. In: *J Rheumatol*, 17. Jg. (10), S. 1329-1334.
- Olazagasti, Jeannette M. et al. (2015): Cancer Risk in Dermatomyositis: A Meta-Analysis of Cohort Studies. In: *American Journal of Clinical Dermatology*, 16. Jg. (2), S. 89-98.
- Oxenhandler, R. et al. (1982): Pathologic features of muscle in systemic lupus erythematosus: a biopsy series with comparative clinical and immunopathologic observations. In: *Hum Pathol*, 13. Jg. (8), S. 745-757.
- Paik, J. J. et al. (2021): Study of Tofacitinib in Refractory Dermatomyositis: An Open-Label Pilot Study of Ten Patients. In: *Arthritis Rheumatol*, 73. Jg. (5), S. 858-865.
- Papadopoulou, Charalampia et al. (2021): The Vasculopathy of Juvenile Dermatomyositis: Endothelial Injury, Hypercoagulability, and Increased Arterial Stiffness. In: *Arthritis & Rheumatology*, 73. Jg. (7), S. 1253-1266.

- Patwardhan, Anjali/Spencer, Charles H. (2021): Biologics in refractory idiopathic inflammatory myositis (IIM): What experience in juvenile vs adult myositis tells us about the use of biologics in pediatric IIM. In: *Modern Rheumatology*, 31. Jg. (5), S. 933-948.
- Pinal-Fernandez, Iago et al. (2017): A longitudinal cohort study of the anti-synthetase syndrome: increased severity of interstitial lung disease in black patients and patients with anti-PL7 and anti-PL12 autoantibodies. In: *Rheumatology*, 56. Jg. (6), S. 999-1007.
- Preuße, Corinna et al. (2016): Differential roles of hypoxia and innate immunity in juvenile and adult dermatomyositis. In: *Acta Neuropathologica Communications*, 4. Jg. (1).
- Record, Jessica L./Beukelman, Timothy/Cron, Randy Q. (2011): High prevalence of myositis in a southeastern United States pediatric systemic lupus erythematosus cohort. In: *Pediatric Rheumatology*, 9. Jg. (1), S. 20.
- Rider, L. G./Nistala, K. (2016): The juvenile idiopathic inflammatory myopathies: pathogenesis, clinical and autoantibody phenotypes, and outcomes. In: *Journal of Internal Medicine*, 280. Jg. (1), S. 24-38.
- Rider, Lisa G. (2011): Deciphering the Clinical Presentations, Pathogenesis, and Treatment of the Idiopathic Inflammatory Myopathies. In: *JAMA*, 305. Jg. (2), S. 183.
- Riedelsheimer, Bernd/Büchl-Zimmermann, Simone (2015): Färbungen. In: Mulisch, Maria/Welsch, Ulrich (Hrsg.): *Romeis - Mikroskopische Technik*. 19. Auflage, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, S. 171-282.
- Sag, Erdal et al. (2021): Inflammatory milieu of muscle biopsies in juvenile dermatomyositis. In: *Rheumatology International*, 41. Jg. (1), S. 77-85.
- Schänzer, A. et al. (2018): Dysregulated autophagy in restrictive cardiomyopathy due to Pro209Leu mutation in BAG3. In: *Molecular Genetics and Metabolism*, 123. Jg. (3), S. 388-399.
- Siegert, Elise et al. (2021): Systemic sclerosis-associated myositis features minimal inflammation and characteristic capillary pathology. In: *Acta Neuropathologica*, 141. Jg. (6), S. 917-927.
- Smith, Lauren N./Paik, Julie J. (2020): Promising and Upcoming Treatments in Myositis. In: *Current Rheumatology Reports*, 22. Jg. (10).
- Soponkanaporn, S. et al. (2019): Expression of myxovirus-resistance protein A: a possible marker of muscle disease activity and autoantibody specificities in juvenile dermatomyositis. In: *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 45. Jg. (4), S. 410-420.
- Stenzel, Werner et al. (2021): Inflammatory myopathies in childhood. In: *Neuromuscular Disorders*, 31. Jg. (10), S. 1051-1061.
- Svensson, John et al. (2017): Incidence and prevalence of idiopathic inflammatory myopathies in Sweden: a nationwide population-based study. In: *Rheumatology*, 56. Jg. (5), S. 802-810.
- Tanboon, Jantima et al. (2020): Where are we moving in the classification of idiopathic inflammatory myopathies? In: *Current Opinion Neurology*, 33. Jg. (5/6), S. 590-603.
- Tansley, Sarah L et al. (2017): Autoantibodies in juvenile-onset myositis: their diagnostic value and associated clinical phenotype in a large UK cohort. In: *Journal of Autoimmunity*, 84. Jg., S. 55-64.

- Tansley, Sarah L. et al. (2014): Calcinosis in juvenile dermatomyositis is influenced by both anti-NXP2 autoantibody status and age at disease onset. In: *Rheumatology*, 53. Jg. (12), S. 2204-2208.
- Tansley, Sarah L./McHugh, Neil J./Wedderburn, Lucy R. (2013): Adult and juvenile dermatomyositis: are the distinct clinical features explained by our current understanding of serological subgroups and pathogenic mechanisms? In: *Arthritis Research & Therapy*, 15. Jg. (2), S. 211.
- Tezak, Zivana et al. (2002): Gene Expression Profiling in DQA1*0501+Children with Untreated Dermatomyositis: A Novel Model of Pathogenesis. In: *The Journal of Immunology*, 168. Jg. (8), S. 4154-4163.
- Tisseverasinghe, Annaliese/Bernatsky, Sasha/Pineau, Christian A. (2009): Arterial Events in Persons with Dermatomyositis and Polymyositis. In: *The Journal of Rheumatology*, 36. Jg. (9), S. 1943-1946.
- Turnier, Jessica L et al. (2021): Comparison of lesional juvenile myositis and lupus skin reveals overlapping yet unique disease pathophysiology. In: *Arthritis & Rheumatology*, 73. Jg. (6), S. 1062-1072.
- Uruha, A. et al. (2019): Diagnostic potential of sarcoplasmic myxovirus resistance protein A expression in subsets of dermatomyositis. In: *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 45. Jg. (5), S. 513-522.
- Varsani, H. et al. (2015): Validation of a score tool for measurement of histological severity in juvenile dermatomyositis and association with clinical severity of disease. 74. Jg. (1), S. 204-210.
- Vilela, Veronica Silva et al. (2015): Polymyositis, a very uncommon isolated disease: clinical and histological re-evaluation after long-term follow-up. In: *Rheumatology International*, 35. Jg. (5), S. 915-920.
- Walsh, Ronan J. et al. (2007): Type I interferon-inducible gene expression in blood is present and reflects disease activity in dermatomyositis and polymyositis. In: *Arthritis & Rheumatism*, 56. Jg. (11), S. 3784-3792.
- Watanabe, Yurika et al. (2016): Clinical features and prognosis in anti-SRP and anti-HMGCR necrotising myopathy. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 87. Jg. (10), S. 1038-1044.
- Wedderburn, Lucy R./Rider, Lisa G. (2009): Juvenile dermatomyositis: new developments in pathogenesis, assessment and treatment. In: *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 23. Jg. (5), S. 665-678.
- Wedderburn, Lucy R. et al. (2007): International consensus on a proposed score system for muscle biopsy evaluation in patients with juvenile dermatomyositis: A tool for potential use in clinical trials. In: *Arthritis & Rheumatism*, 57. Jg. (7), S. 1192-1201.
- Welsch, Ulrich (2015): Enzymhistochemie. In: Mulisch, Maria/Welsch, Ulrich (Hrsg.): *Romeis - Mikroskopische Technik*. 19. Auflage, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, S. 400-415.
- Welsch, Ulrich/Deller, Thomas/Kummer, Wolfgang (2018): Begriffe und Methodik. In: Welsch, Ulrich/Kummer, Wolfgang (Hrsg.): *Histologie - Das Lehrbuch*. 5. Auflage, München: Elsevier GmbH, S. 1-13.
- Welsch, Ulrich/Kummer, Wolfgang (2014): Muskelgewebe. In: Welsch, Ulrich/Kummer, Wolfgang (Hrsg.): *Lehrbuch Histologie*. 4. Auflage, München: Elsevier GmbH, S. 140-158.
- Whitaker, John N./Engel, W. King (1972): Vascular Deposits of Immunoglobulin and Complement in Idiopathic Inflammatory Myopathy. In: *New England Journal of Medicine*, 286. Jg. (7), S. 333-338.

- Wiesinger, G. F. et al. (2000): Aerobic capacity in adult dermatomyositis/polymyositis patients and healthy controls. In: *Arch Phys Med Rehabil*, 81. Jg. (1), S. 1-5.
- Wong, David et al. (2012): Interferon and Biologic Signatures in Dermatomyositis Skin: Specificity and Heterogeneity across Diseases. In: *PLoS ONE*, 7. Jg. (1), S. e29161.
- Woo, M./Chung, S. J./Nonaka, I. (1988): Perifascicular atrophic fibers in childhood dermatomyositis with particular reference to mitochondrial changes. In: *J Neurol Sci*, 88. Jg. (1-3), S. 133-143.
- Wright, Caroline F./Fitzpatrick, David R./Firth, Helen V. (2018): Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. In: *Nature Reviews Genetics*, 19. Jg. (5), S. 253-268.
- Wu, Jian-Qiang/Lu, Mei-Ping/Reed, Ann M. (2020): Juvenile dermatomyositis: advances in clinical presentation, myositis-specific antibodies and treatment. In: *World Journal of Pediatrics*, 16. Jg. (1), S. 31-43.
- Yasin, S. A. et al. (2019): Histological heterogeneity in a large clinical cohort of juvenile idiopathic inflammatory myopathy: analysis by myositis autoantibody and pathological features. In: *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 45. Jg. (5), S. 495-512.
- Yasin, Shireena A. et al. (2014): Tubuloreticular inclusions in juvenile dermatomyositis: a diagnostically useful marker? In: *Pediatric Rheumatology*, 12. Jg. (S1), S. P91.
- Yekeer, Richard M. et al. (2018): Anti-NT5C1A autoantibodies are associated with more severe disease in patients with juvenile myositis. In: *Annals of the Rheumatic Diseases*, 77. Jg. (5), S. 714-719.
- Yu, K. H. et al. (2013): Prevalence and incidence in patients with autoimmune rheumatic diseases: a nationwide population-based study in Taiwan. In: *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 65. Jg. (2), S. 244-250.
- Zöller, Bengt et al. (2012): Risk of Subsequent Coronary Heart Disease in Patients Hospitalized for Immune-Mediated Diseases: A Nationwide Follow-Up Study from Sweden. In: *PLoS ONE*, 7. Jg. (3), S. e33442.
- Zoske, Jan et al. (2021): Performance of ENMC and EULAR/ACR classification systems applied to a single tertiary center cohort of dermatomyositis patients. In: *Neurological Research and Practice*, 3. Jg.

12 Publikationsverzeichnis

- **Schänzer, A., Rager, L., Dahlhaus, I., Dittmayer, C., Preusse, C., Della Marina, A., Goebel, H., Hahn, A., Stenzel, W. „Morphological Characteristics of Idiopathic Inflammatory Myopathies in Juvenile Patients“**
Cells 2021 Dec 30;11(1):109. doi: 10.3390/cells11010109

Geteilte Erst-Koautorenschaft
- **Rager, L., Meyer, M., Yenigün, M., Preusse, C., Krämer-Best, H., Wolff, S., Stenzel, W., Schänzer, A. „Neuer Muskelphänotyp bei einem Patienten mit ausgeprägter NXP2-assoziiierter Myositis“/ „Pronounced focal muscle pathology in a patient with Anti-NXP2 autoantibody associated severe myositis“**

Posterpräsentation, *Neurowoche Berlin, 30. Oktober bis 3. November 2018*,
91. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 44. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie, 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie, *Nervenheilkunde*, 2019; 38 (05): 287

Posterpräsentation, *2. Science Day des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 16. November 2018*, Posterpreis Bereich „Klinische Forschung/ Patientennahe Forschung“
- **Rager, L., Hahn, A., Preusse, C., Stenzel, W., Schänzer, A. “Role of MxA Expression and Electron Microscopy for Diagnosing DM in Muscle Biopsies from Children with Myositis”**

Posterpräsentation, *3. Science Day des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 1. November 2019*

Pronounced focal muscle pathology in a patient with Anti-NXP2 autoantibody associated severe myositis

JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN

Leonie Rager¹, Marco Meyer², Mesut Yenigün², Corinna Preusse³, Heidrun Krämer-Best², Stephanie Wolff², Werner Stenzel³, Anne Schänzer¹

1 Institute of Neuropathology, Justus Liebig University, Gießen, Germany; 2 Department of Neurology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany; 3 Institute of Neuropathology, Charité – Berlin, Berlin, Germany

Introduction: Idiopathic inflammatory myopathies (IIM's) including dermatomyositis (DM), polymyositis (PM), immune-mediated-necrotizing-myopathy (IMNM) and sporadic inclusion body myositis (sIBM) are based at the clinical presentation and muscle pathology. Myositis specific autoantibodies (MSAs) and Myositis associated autoantibodies (MAAs) are useful tools for identifying subgroups and predicting the clinical progress and outcome under therapy. Anti-NXP2 is a major MSA in juvenile DM and is associated with a more severe muscle pathology. In adults IIM, anti-NXP2 is rare and muscle pathology findings are sparse.

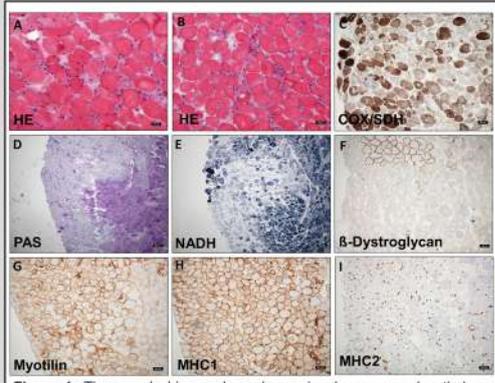


Figure 1: The muscle biopsy showed a regional pronounced pathology with oedema (A,B) decreased expression in enzymatic stains (C-E) and reduced expression of membrane proteins (F). Antibodies against Myotilin (G) showed myofibrillar desorganization. There was a strong upregulation of MHC1 (H) but not MHC2 (I).

Case report: We describe a 59 year old male patient with an acute proximal myopathy and increased CK (40.000 U/l). MRI images of the proximal thigh showed muscle oedema and areas with high signal intensity suggestive for myositis (Fig.2). The muscle biopsy showed a large regional oedema with pre-necrotic muscle fibres with decreased enzymatic staining. MHC1 was upregulated in these muscle fibres with deposits of complement (C5b9) without significant lymphocytic infiltrates (Fig.1,3). The pathology was similar as described in regional ischemic myopathy (RIIM) [1]. RIIM is proposed as an own entity from some authors but has not been included in the classification of IIM. In the follow up high positive MSA like NXP2 and MAA such as PM75 and RO52 antibodies were detected. Electrone microscopy showed microtubular inclusions in endothelial cells and pericytes of endomysial capillaries (Fig.4). Immunohistochemistry with a sarcoplasmic expression of Myxovirus resistance A (MxA) are consistent with this diagnosis of a DM [2] (Fig.3). Under immunosuppression the patient's muscle strength improved, the level of NXP2 decreased and PM75 was not detectable whereas RO52 was still high (Fig.5). The patient was former smoker but tumor screening as PET-CT (Fig.6) was negative.

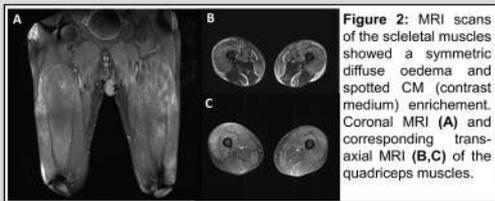


Figure 2: MRI scans of the skeletal muscles showed a symmetric diffuse oedema and spotted CM (contrast medium) enrichment. Coronal MRI (A) and corresponding transaxial MRI (B,C) of the quadriceps muscles.

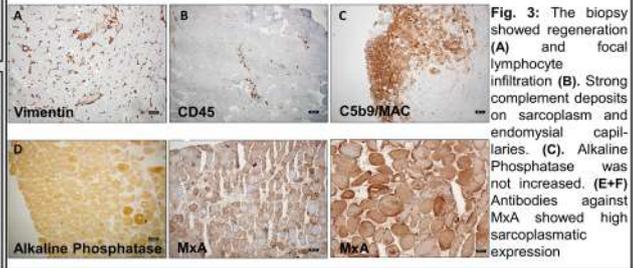


Figure 3: The biopsy showed regeneration (A) and focal lymphocyte infiltration (B). Strong complement deposits on sarcoplasm and endomysial capillaries. (C). Alkaline Phosphatase was not increased. (E-F) Antibodies against MxA showed high sarcoplasmic expression.

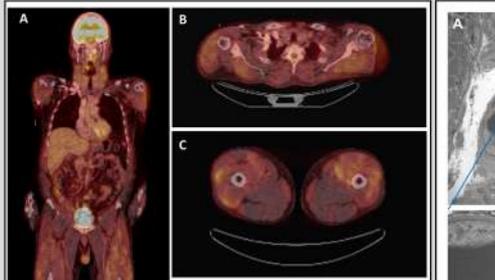


Figure 6: Heightened glucose metabolism in the skeletal muscles of the body trunk and increased fat tissue in both psoas muscles. No signs of malignancy. (A) Coronal PET-CT (B) Transaxial PET-CT of the deltoid muscles (C) Transaxial PET-CT of the quadriceps muscles.

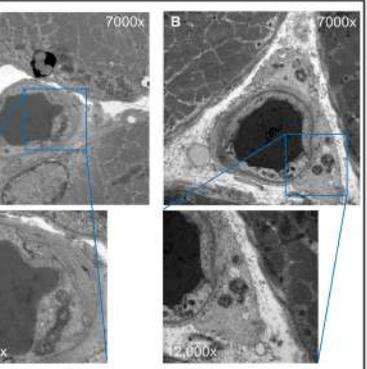


Figure 4: The TEM displayed tubular reticular inclusions in the endothelial cells (A) and pericytes (B) of endomysial capillaries.

Antibody	Pre-treatment	Post-treatment
NXP2	Positive	Decreased
PM75	Positive	Not detectable
Ro52	Positive	Constant
Ro90	Negative	Negative
Ro125	Negative	Negative
Ro153	Negative	Negative
Ro180	Negative	Negative
Ro200	Negative	Negative
Ro230	Negative	Negative
Ro270	Negative	Negative
Ro320	Negative	Negative
Ro375	Negative	Negative
Ro400	Negative	Negative
Ro450	Negative	Negative
Ro500	Negative	Negative
Ro550	Negative	Negative
Ro600	Negative	Negative
Ro650	Negative	Negative
Ro700	Negative	Negative
Ro750	Negative	Negative
Ro800	Negative	Negative
Ro850	Negative	Negative
Ro900	Negative	Negative
Ro950	Negative	Negative
Ro1000	Negative	Negative
Ro1050	Negative	Negative
Ro1100	Negative	Negative
Ro1150	Negative	Negative
Ro1200	Negative	Negative
Ro1250	Negative	Negative
Ro1300	Negative	Negative
Ro1350	Negative	Negative
Ro1400	Negative	Negative
Ro1450	Negative	Negative
Ro1500	Negative	Negative
Ro1550	Negative	Negative
Ro1600	Negative	Negative
Ro1650	Negative	Negative
Ro1700	Negative	Negative
Ro1750	Negative	Negative
Ro1800	Negative	Negative
Ro1850	Negative	Negative
Ro1900	Negative	Negative
Ro1950	Negative	Negative
Ro2000	Negative	Negative
Ro2050	Negative	Negative
Ro2100	Negative	Negative
Ro2150	Negative	Negative
Ro2200	Negative	Negative
Ro2250	Negative	Negative
Ro2300	Negative	Negative
Ro2350	Negative	Negative
Ro2400	Negative	Negative
Ro2450	Negative	Negative
Ro2500	Negative	Negative
Ro2550	Negative	Negative
Ro2600	Negative	Negative
Ro2650	Negative	Negative
Ro2700	Negative	Negative
Ro2750	Negative	Negative
Ro2800	Negative	Negative
Ro2850	Negative	Negative
Ro2900	Negative	Negative
Ro2950	Negative	Negative
Ro3000	Negative	Negative
Ro3050	Negative	Negative
Ro3100	Negative	Negative
Ro3150	Negative	Negative
Ro3200	Negative	Negative
Ro3250	Negative	Negative
Ro3300	Negative	Negative
Ro3350	Negative	Negative
Ro3400	Negative	Negative
Ro3450	Negative	Negative
Ro3500	Negative	Negative
Ro3550	Negative	Negative
Ro3600	Negative	Negative
Ro3650	Negative	Negative
Ro3700	Negative	Negative
Ro3750	Negative	Negative
Ro3800	Negative	Negative
Ro3850	Negative	Negative
Ro3900	Negative	Negative
Ro3950	Negative	Negative
Ro4000	Negative	Negative
Ro4050	Negative	Negative
Ro4100	Negative	Negative
Ro4150	Negative	Negative
Ro4200	Negative	Negative
Ro4250	Negative	Negative
Ro4300	Negative	Negative
Ro4350	Negative	Negative
Ro4400	Negative	Negative
Ro4450	Negative	Negative
Ro4500	Negative	Negative
Ro4550	Negative	Negative
Ro4600	Negative	Negative
Ro4650	Negative	Negative
Ro4700	Negative	Negative
Ro4750	Negative	Negative
Ro4800	Negative	Negative
Ro4850	Negative	Negative
Ro4900	Negative	Negative
Ro4950	Negative	Negative
Ro5000	Negative	Negative

Figure 5: The patient showed positive NXP2, PM75 and Ro52 antibodies before treatment. (A) During immunosuppressive treatment, NXP2 decreased, whereas the MAAs Ro52 remained constant and PM75 completely lowered. (B)

Conclusion: We demonstrate a new muscle phenotype in a severe adult IIM associated with anti-NXP2 MSA showing a strong focal pathology resembling a focal ischemic damage whereas TEM findings and additional MxA expression is contributing to the diagnosis of DM.

References: [1] Cai, C. et al. A Regional Ischemic Immune Myopathy: A Paraneoplastic Dermatomyositis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2014;73(12):1126-1133 [2] Uhura, A. et al. Sarcoplasmic MxA expression. A valuable marker of dermatomyositis. *Neurology* 2017;88:493-500



Role of MxA Expression and Electron Microscopy for Diagnosing DM in Muscle Biopsies from Children with Myositis

Leonie Rager¹, Andreas Hahn², Corinna Preusse³, Werner Stenzel³, Anne Schänzer¹

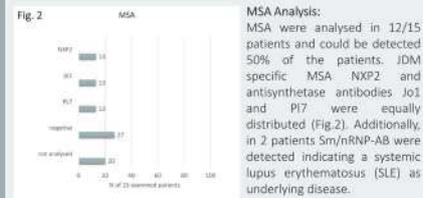
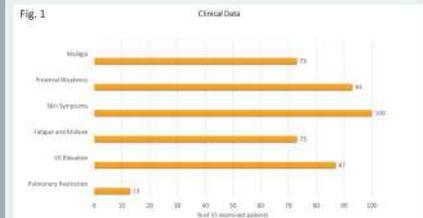
1 Institute of Neuropathology, Justus Liebig University, Gießen, Germany; 2 Department of Child Neurology, Justus Liebig University Giessen, Germany; 3 Department of Neuropathology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Introduction: Muscle biopsies in juvenile dermatomyositis (JDM) show a variable pathology with subfascicular atrophy, inflammatory cells, punched-out-vacuoles (POV) and upregulation of MHC1. Sometimes the pathology is only subtle and delimitation from other myositis-subtypes or hereditary myopathies is difficult, especially if myositis specific antibodies (MSA) were not analysed or absent. Therefore, more specific markers are necessary for providing a good diagnostic strategy. Myxovirus resistance A (MxA) is a type 1 interferon-inducible protein and upregulation on muscle fibers is described being specific for DM [1,2].

Material and Methods: Muscle biopsies from 15 young patients (mean age of 8.9±4.6, range 3-19 years, 73% female) with the clinical diagnosis of myositis and 7 age matched controls (mean age 12.3±3.6, range 8-17 years, 33% female) were analysed with standard enzymatic stains, immunohistochemistry (IHC) including antibodies against MxA, CSb9, MHC1 and MHC2 and transmission electron microscopy (TEM). Additionally, the morphology was graded with a defined JDM score (Visual Analogue Score, VAS [3]). The results were compared with clinical findings and MSA results.

Results:

1. Clinical Findings: The patients with the clinical diagnosis of myositis showed in average 9 years of age at the time of biopsy. Interestingly, a large number of patients presented mood changes with sadness, loss of appetite, mood fluctuation and social withdrawal. All patients presented skin symptoms e.g. dryness, reddening, malar rash, calcinosis or Gottron's papules (Fig.1).



2. Analyses of Muscle Biopsies:
Muscle pathology grading: In H&E stained sections muscle pathology was visible in all biopsies from patients with myositis. The VAS score was high in 40% of the patients indicating a strong pathology. Inflammatory cells could be detected in the majority of cases (Fig. 3 and 4).
IHC findings: With immunohistochemistry MHC1 and MHC2 was upregulated in the majority of the cases. Sarcolemmal MxA expression was seen in 80% of the cases but not in the controls (Fig. 3 and 5).

TEM analysis: At ultrastructural analysis 62% (8/13) of the patients showed tubuloreticular inclusions (EITEM) in the endothelial cells of the endomyial capillaries (Fig.3).

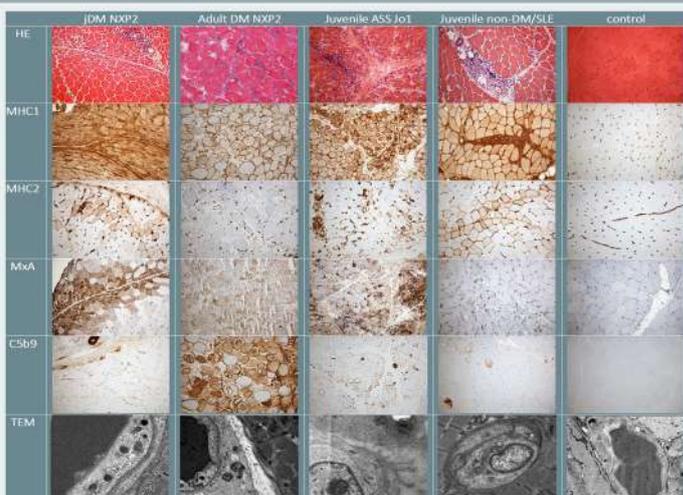
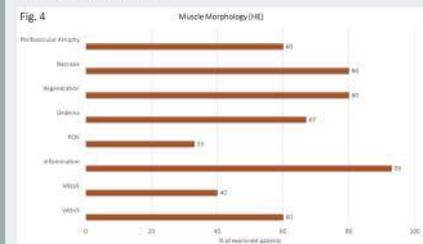
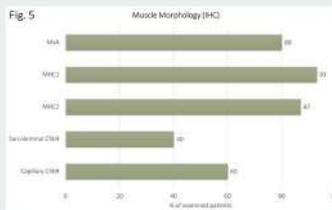
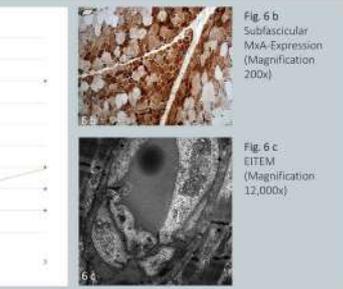
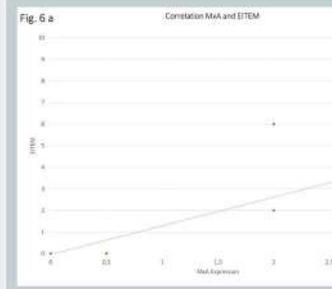


Fig. 3 Muscle morphology findings in patients with myositis compared to control. (Magnification: Cryosections x 200, TEM x 12,000)



3. Correlation of MxA Expression with MSA and EITEM: All patients with EITEM showed an upregulation with MxA. Interestingly, the severity of MxA expression correlated with total number of EITEM (Fig. 6a-c). MxA Expression is described as a specific marker for JDM [1] and the absence of MxA in patients with antisynthetase syndrome (ASS) is stated [4]. Interestingly, in our cohort 2 patients with Jo1-associated ASS-myositis showed an upregulation of MxA and endothelial inclusions in TEM (EITEM). No expression of MxA or EITEM was found in patients with PL7-associated myositis (n=2), unspecified myositis (n=2) and in the controls (n=7).



Conclusion:

- In juvenile myositis analysing MSA is less frequent and clinical symptoms, MSA findings and muscle morphology might differ from adult patients.
- In the majority of our juvenile cases with myositis muscle morphology showed DM-like-pattern with strong pathology.
- MxA was expressed in the majority of JDM-cases including Jo1-associated ASS but not in PL7-associated ASS.
- MxA expression showed a correlation with EITEM at electron microscopy.
- Analyzing MxA expression and EITEM at muscle biopsies from children with myositis may help estimating the underlying disease e.g. JDM or Jo1-associated ASS.

References:
 [1] Gruha, A. et al (2017): Sarcolemmal MxA expression: a valuable marker of dermatomyositis. *Neurology*, 88(5), 493-500.
 [2] Supramaniam, S. et al (2019): Expression of myxovirus resistance protein A, a possible marker of muscle disease activity and autoantibody specificities in juvenile dermatomyositis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 45(4), 410-420.
 [3] Weis, K. et al (2015): Validation of a score tool for measurement of histological severity in juvenile dermatomyositis and association with clinical severity of disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(11), 204-210.
 [4] Inoue, M. et al (2019): Absence of sarcolemmal MxA expression in antisynthetase syndrome in cohort of 194 cases. *Neuropathol Appl Neurobiol*.

Artikel: Schänzer, A., Rager, L., Dahlhaus, I., Dittmayer, C., Preusse, C., Della Marina, A., Goebel, H., Hahn, A., Stenzel, W. „Morphological Characteristics of Idiopathic Inflammatory Myopathies in Juvenile Patients“

Cells 2021 Dec 30;11(1):109. doi: 10.3390/cells11010109



Article

Morphological Characteristics of Idiopathic Inflammatory Myopathies in Juvenile Patients

Anne Schänzer ^{1,*†}, Leonie Rager ^{1,†}, Iris Dahlhaus ², Carsten Dittmayer ³, Corinna Preusse ^{3,4}, Adela Della Marina ⁵, Hans-Hilmar Goebel ³, Andreas Hahn ⁶ and Werner Stenzel ³

¹ Institute of Neuropathology, Justus Liebig University, 35392 Giessen, Germany;

leonie.rager@med.uni-giessen.de

² Institute of Medical Informatics, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin und Humboldt-Universität zu Berlin, 10117 Berlin, Germany; iris.dahlhaus@charite.de

³ Department of Neuropathology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin und Humboldt-Universität zu Berlin, 10117 Berlin, Germany; carsten.dittmayer@charite.de (C.D.); corinna.preusse@charite.de (C.P.); hans-hilmar.goebel@charite.de (H.-H.G.); werner.stenzel@charite.de (W.S.)

⁴ Department of Neurology with Institute of Translational Neurology, University Hospital Münster, 45147 Münster, Germany

⁵ Department of Pediatric Neurology, Centre for Neuromuscular Disorders, Centre for Translational Neuro- and Behavioral Sciences, University Duisburg-Essen, 45122 Essen, Germany; adela.dellamarina@uk-essen.de

⁶ Department of Child Neurology, Justus Liebig University, 35392 Giessen, Germany;

andreas.hahn@paediat.med.uni-giessen.de

* Correspondence: anne.schaenzer@patho.med.uni-giessen.de; Tel.: +49-641-9941184; Fax: +49-99641-41189

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Schänzer, A.; Rager, L.; Dahlhaus, I.; Dittmayer, C.; Preusse, C.; Della Marina, A.; Goebel, H.-H.; Hahn, A.; Stenzel, W. Morphological Characteristics of Idiopathic Inflammatory Myopathies in Juvenile Patients. *Cells* **2022**, *11*, 109. <https://doi.org/10.3390/cells11010109>

Academic Editor: Russell T. Hepple

Received: 18 November 2021

Accepted: 25 December 2021

Published: 30 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: In juvenile idiopathic inflammatory myopathies (IIMs), morphological characteristic features of distinct subgroups are not well defined. New treatment strategies require a precise diagnosis of the subgroups in IIM, and, therefore, knowledge about the pathomorphology of juvenile IIMs is warranted. **Methods:** Muscle biopsies from 15 patients (median age 8 (range 3–17) years, 73% female) with IIM and seven controls were analyzed by standard methods, immunohistochemistry, and transmission electron microscopy (TEM). Detailed clinical and laboratory data were accessed retrospectively. **Results:** Proximal muscle weakness and skin symptoms were the main clinical symptoms. Dermatomyositis (DM) was diagnosed in 9/15, antisynthetase syndrome (ASyS) in 4/15, and overlap myositis (OM) in 2/15. Analysis of skeletal muscle tissues showed inflammatory cells and diffuse upregulation of MHC class I in all subtypes. Morphological key findings were COX-deficient fibers as a striking pathology in DM and perimysial alkaline phosphatase positivity in anti-Jo-1-ASyS. Vascular staining of the type 1 IFN-surrogate marker, MxA, correlated with endothelial tubuloreticular inclusions in both groups. None of these specific morphological findings were present in anti-PL7-ASyS or OM patients. **Conclusions:** Morphological characteristics discriminate IIM subtypes in juvenile patients, emphasizing differences in aetiopathogenesis and supporting the notion of individual and targeted therapeutic strategies.

Keywords: myositis; dermatomyositis; muscle pathology; overlap myositis; juvenile; anti-synthetase syndrome

1. Introduction

Idiopathic inflammatory myopathy (IIM) is the most common form of myopathy in adult patients. Based on new insights in pathogenesis, it has become clear that individual immunomodulatory therapy strategies may be helpful for patients who do not respond sufficiently to current standard therapy [1,2]. Classification of IIM has been based on clinical, serological, and morphological features that lead to further definition of distinct subgroups, such as dermatomyositis (DM), antisynthetase syndrome (ASyS), immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM), and sporadic inclusion body myositis (sIBM) [3–6]. Additionally,

myositis can be associated with various rheumatologic diseases and is then named overlap myositis (OM) [7,8]. The currently used classification of myositis, based on pathophysiological and immunological insights, suggests that subtype-specific therapy may be the best treatment option [9].

Juvenile idiopathic inflammatory myopathy (jIIM) has many features in common with adult IIM. Both age groups harbor distinct clinical phenotypes, autoantibody findings, and associated outcomes [10–13]. However, a stringent classification of jIIM, including clinical, serological, and morphological features, similar to the one in adult patients, does not exist. This results in uncertainty when assigning children with myositis to different subgroups, and makes interpretation of study results and assessment of outcomes, including therapy failure, difficult. Myositis specific antibodies (MSAs) are implemented to diagnose juvenile IIM, allowing the delineation of distinct subtypes, such as DM, ASyS, and necrotizing myopathy (IMNM). Dependent on the respective studies, up to 50–90% of the patients show that MSAs with the most frequent antibodies are anti-MDA5, anti-NXP2, and anti-TIF-1 γ [11,13–16].

Myositis, in conjunction with skin lesions, is also seen in other rheumatologic disorders, such as systemic lupus erythematosus (SLE), connective tissue diseases, and some monogenic autoinflammatory diseases, further impeding the diagnosis and treatment of jIIM [14,17–20]. Moreover, in jIIM patients with negative autoantibodies, finding a precise diagnosis can be problematic (although it is currently not known whether autoantibodies have the same relevance in children as in adults).

Juvenile DM is the most common form of jIIM affecting 2–4/100,000 children per year [11,21]. JDM can start as early as two years, and girls are more often affected than boys [10,22]. Clinical key features are skeletal muscle weakness with signs of inflammation on MRI and muscle biopsy, skin lesions, and systemic organ involvement. Phenotype and prognosis are highly variable [23]. Lipodystrophy and calcinosis uncommon in adult DM are frequently reported in jDM [24]. MSA can be detected in approximately 70% of patients. NXP-2 and TIF1 γ antibodies are most frequent, followed by MDA5 and Mi-2 [25–27] antibodies. With the introduction of corticosteroids, mortality has dropped to 2–3% [13]. However, steroid resistance in some patients results in poor prognosis and warrants new therapeutic strategies [28]. IFN-related endothelial injury and Janus kinase (JAK) inhibition has emerged as a novel therapeutic strategy in difficult-to-treat cases [1,29,30].

Clinical characteristics, MSA profiles, and muscle pathology are well described in adult DM, but can be different in jDM (for review see Tanboon et al., 2020 [6]) [3,31,32]. These differences are not fully explained and may reflect different modifying factors in jDM and aDM [22]. Muscle biopsies show the morphological hallmarks of perifascicular pathology and inflammatory cells with a high variability of pathology in both adult and juvenile DM [25,26,33]. However, distinct morphological features in MSA-defined DM subgroups and association with clinical phenotypes are mainly described in aDM [11,26].

Autoantibodies against the cytoplasmic aminoacyl-tRNA synthetase (ARS) are associated with ASyS [34–36]. The frequency of ARS antibodies and, hence, the anti-synthetase syndrome are much lower in children (1–3%) compared to adults (30–40%) [13,37]. Clinical manifestation is similar in all age groups often associated with interstitial pneumonia [38]. The morphological hallmark of ASyS is a necrotizing perifascicular myositis with strong staining of the fragmented perimysium in alkaline phosphatase preparations in Jo1-associated ASyS [39,40]. Additionally, myonuclear actin filament inclusions are a unique morphological feature in adult ASyS [41].

Finally, IMNM is associated with severe muscle weakness, high creatine kinase levels, no or little skin involvement, and scattered necrotic and regenerating fibers at muscle biopsy [42,43]. IMNM is paradigmatically associated with anti-HMCCR or anti-SRP autoantibodies. IMNM is rare in children accounting for 1–4% of all jIIM cases [13,14,44,45].

In this single tertiary center study, we performed a detailed semi-quantitative analysis of muscle biopsies from fifteen children diagnosed with jIIM and seven non-diseased controls based on enzymatic stains, immunohistochemistry, and electron microscopy, and

compared the morphological findings with clinical and laboratory data. The aim of the study was to identify morphological key findings which discriminate the different subtypes of juvenile IIM.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects and Samples

Fifteen juvenile patients with the clinical diagnosis of myositis were included in the study. Patients were recruited from the department of pediatric neurology, Giessen, between 2002 and 2018. An open muscle biopsy was performed on all patients. Clinical and laboratory data were retrospectively analyzed in the database. Controls were obtained from seven age-matched children, who received a muscle biopsy because of suspected neuromuscular disorder or metabolic disease confirmed by biopsy and further clinical follow-up. All control muscle biopsies did not show any overt pathological changes, including thorough studies of immune phenomena. The median age at biopsy was 12 (9–17) years, 33% female.

2.2. Muscle Pathology Analysis

2.2.1. Histochemical, Enzymatic and Immunohistochemical Microscopy

The unfixed muscle tissue was snap-frozen, and 6- μ m cryosections were processed for histochemical and enzymatic staining, according to standard procedures including hämalum eosin (H&E) combined cytochrome-c-oxidase (COX)-succinate dehydrogenase (SDH), Gömöri trichrome, and alkaline phosphatase (ALP) [46]. Immunohistochemical stains were performed on cryosections using a Bench Mark XT automatic staining platform (Ventana, Heidelberg, Germany) with the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-LC3 (0231-100/LC3-5F10, nanoTools, 1:100, Teningen, Germany); mouse monoclonal anti-p62 (610832, BD Biosciences, 1:500, Franklin Lakes, NJ, USA); mouse monoclonal anti-MHC class I (M0736, DAKO, 1:500); mouse monoclonal anti-MHC class II (M0775, DAKO, 1:200); mouse monoclonal anti-c5b-9 (M0777, DAKO, 1:50); mouse monoclonal anti-CD 31 (M0823, DAKO, 1:500); rabbit polyclonal anti-MxA2 (sc-50509, Santa Cruz, 1:100); mouse monoclonal anti-VEGF (sc 7269, Santa Cruz, 1:100); mouse monoclonal anti-Myotilin (RS034, Novocastra, 1:50); mouse monoclonal anti-MHCD (RNMy2/9D2, Novocastra, 1:20); mouse monoclonal anti-CD56 (18-0152, Invitrogen); mouse monoclonal anti-CD68 (M0814, DAKO, 1:100); mouse monoclonal anti-CD20 (M0755, DAKO, 1:100); mouse monoclonal anti-CD8 (M7103, DAKO, 1:500); and rabbit monoclonal anti-CD3 (RM-9107-S0, Medac, 1:200) (Supplementary Table S1). Sections were examined with a Nikon eclipse 80i microscope, equipped with a Nikon digital camera DS-Fi1.

The muscle pathology was scored semi-quantitatively according to a modified consensus ranking scale (VAS) aimed at determining the severity of tissue damage published by Wedderburn and Varsani et al. [47,48], including the following prominent domains: inflammation, vascular, muscle fibers, and connective tissue. Muscle pathology was rated from normal or absent (0) to strongly affected (10) on H&E and Gömöri trichrome stained sections. Additionally, the muscle morphology was rated from normal or absent (0) to strong (3) for perifascicular atrophy, punched-out vacuoles (POV), necrotic muscle fibers, regenerative muscle fiber, oedema, and inflammatory cells using H&E stained sections. ALP staining of fragmented perimysial cells and COX-negative or reduced (pale-blueish) fibers were estimated in standard stains. Antibody-stained sections were rated from physiological expression or absent (0) to strong (3). A reduction in vessel density was rated on anti-CD31 stained sections from normal (0) to strong (3). Three investigators (AS, LR, and WS) were blinded to the specimens during examination. Both AS and WS are experienced with semi-quantitative analysis of muscle sections and have performed similar studies previously [7,49–51].

2.2.2. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Samples for TEM analysis were available for 13/15 patients. Small samples were taken from open muscle biopsies, fixed in 4% glutaraldehyde/0.4 MPBS, and processed according to standard procedures. For contrast in transmission electron microscopy (TEM), ultrathin sections were treated with 3% lead citrate-3H₂O with a Leica EM AC20 (ultrastain kit II) and examined at a Zeiss EM109 TEM, equipped with a sharp eye digital camera. Muscle pathology was scored from normal or absent (0) to strong (3), and myofibrillar disintegration, Z-band alterations, and glycogen deposits were analyzed in longitudinal sections at magnification 12,000×. Mitochondrial pathology and tubuloreticular deposits (TR) in endothelial cells of endomysial capillaries were analyzed in cross sections at magnification 12,000×. At least 10 endomysial capillaries in each specimen were analyzed. The presence of deposits was rated from 0 to 3. Myonuclear actin inclusions were studied in selected cases with ASyS (P4, P14, P6). At minimum, 200 nuclei were analyzed in each specimen.

2.3. Statistical Analysis

To determine whether there were differences among jIIM subgroups DM, ASyS, and OM, with respect to their morphological characteristics (semi-quantitative variables), the Kruskal–Wallis test was performed. Age at biopsy, VAS score, and laboratory parameters were also compared using the Kruskal–Wallis test. All *p*-values were adjusted for multiple testing. R version 4.0.3 was used to perform the analysis.

3. Results

3.1. Clinical Data

Fifteen patients were included in the study. Median age at biopsy was 8 (range 3–17) years, of whom 73% were females (Figure 1A). Duration of disease was subacute (>14 days) in the majority of patients. Dermatological manifestation (100%), muscle weakness (93%), and myalgia (73%) were the key diagnostic elements. Muscle weakness was particularly present in the proximal lower limbs with difficulties in climbing stairs or getting up from the chair. Fatigue (47%) and mood swing with sadness (33%) were reported. Four patients (27%) developed calcinosis. Extramuscular manifestation with pulmonary (20%) and cardiac involvement (27%) occurred (Tables 1 and S2). Specific EMG signs, characteristic of dermato-polymyositis, such as abundant abnormal spontaneous activity (e.g., small positive waves firing at slow rates, defibrillation potentials, myotonic discharges), in conjunction with short polyphasic muscle unit potentials of low amplitude, were detected in 72%. Rather unspecific alterations, such as rare spontaneous activity and a mixture of some polyphasic low-amplitude and normal muscle unit potentials, were present in 27%. Typical muscle MRI findings of dermato-polymyositis, such as marked T2 hyperintensity in the thigh muscles with edema on T2-fat suppressed sequences and marked contrast enhancement on post-gadolinium sequences, were detected in 73%. Characteristic ultrasound abnormalities, such as diffusely increased echogenicity and blurred fibrillar echotexture of the muscle, as well as thickened fascia, were seen in 67% (Tables 1 and S4). Figure 2 shows characteristic skin involvement (A, B) and MRI findings (C–E) of patients with IIM.

Out of 12 children, 6 (50%) had autoantibodies, with anti-NXP-2 (2/12), anti-Jo1 (2/12), and anti-PL-7 (2/12). In two patients, anti-nRNP/Sm antibodies were detected. Anti-nuclear antibodies (ANA) were positive in 69%. Elevated serum CK and LDH levels were the most prominent laboratory features (Figure 1C,D). ASyS patients generally showed higher CK levels compared to the DM and OM groups but did not reach statistical significance (*p* > 0.05) (Figure 1C,D). Extramuscular symptoms did not occur in anti-PL-7-ASyS and OM. Comorbidities were higher in anti-PL-7-ASyS and OM. Accompanying symptoms, such as fatigue, was present in all subgroups. Myalgia was not noted in the two patients with anti-Jo1-ASyS (Supplementary Table S3). Muscle biopsies had been taken before start of therapy in 13/15 patients. Only P13 and P4 received pulse steroid therapy shortly before biopsy.

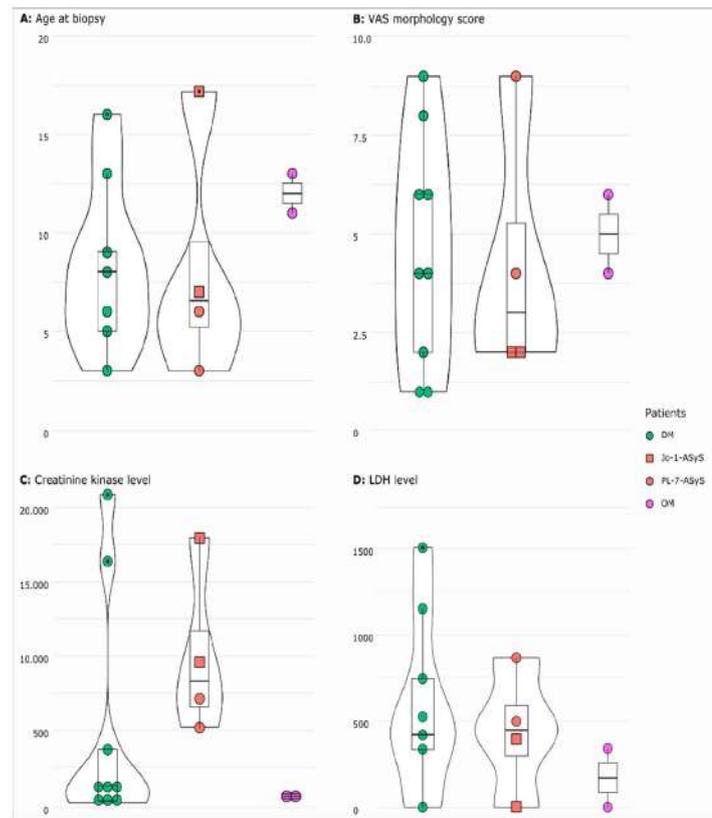


Figure 1. Distribution as violin plot (rotated kernel density curve and boxplot) of age at biopsy (A) VAS morphology score (B), serum creatine kinase (C), and LDH (D) levels in jIIM subgroups DM, ASyS (Jo-1, PL-7), and OM. Wide sections represent a higher probability that the patients take the value and small sections represent a lower probability. The box represents the interquartile range, the whiskers minimum ($Q1 - 1.5 \times IQR$) and maximum ($Q3 + 1.5 \times IQR$), and the points show the outliers. For all parameters, the p -value did not reach statistical significance. (DM = dermatomyositis; ASyS = antisynthetase syndrome; OM = overlap myositis).

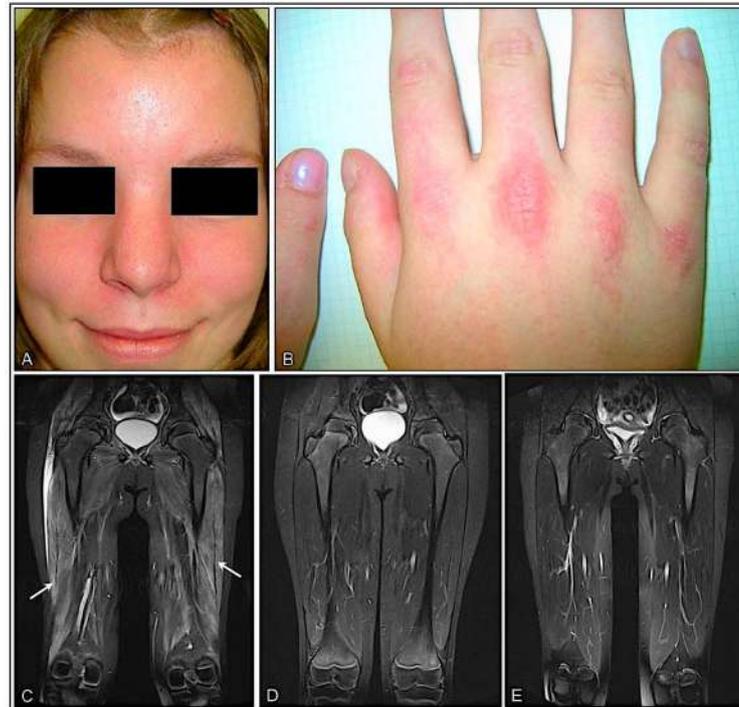


Figure 2. Proximal myopathy and skin lesions are the clinical hallmarks in patients with jIIM. Mild facial erythema (A) and discrete erythematous papules overlying the metacarpal joints (Gotttron’s papules) (B) in a 16-year-old girl with DM (P5). Coronal MR images in a 10-year-old patient with anti-NXP2 antibody-associated DM (P4) showing mild contrast enhancement in T1-weighted images and diffuse oedema of the thigh muscles at first presentation (arrows) (C) resolving completely with treatment after 6 (D) and 12 months (E).

Table 1. Summary of demographic data of patients with jIIM.

Patients with jIIM	
Number of patients	15
Age at biopsy (median)	8 years
range	(3–17 years)
female	11 (73%)
Skeletal muscle symptoms	14 (93%)
Myalgia	11 (73%)
Exercise induced myalgia	6 (40%)
Proximal weakness	14 (93%)
Skin symptoms	15/15 (100%)
Dry skin	6 (40%)
Exanthema	3 (20%)
Erythema	4 (27%)
Butterfly rash	5 (33%)

Table 1. Cont.

Skin symptoms	15/15 (100%)
Redness, livid coloration	8 (53%)
Raynaud's phenomenon	1 (7%)
Gottron's papules	8 (53%)
Nail fold changes	1 (7%)
Calcinosis	4 (27%)
Accompanying symptoms	15/15 (100%)
Fever	3 (20%)
Difficulty swallowing	1 (7%)
Morning stiffness	1 (7%)
Arthritis	1 (7%)
Weight gain	2 (13%)
Weight loss	1 (7%)
Night sweat	1 (7%)
Oedema	3 (20%)
Lymphadenopathy	1 (7%)
Fatigue, concentration difficulties	7 (47%)
Loss of appetite/rejection to drink	1 (7%)
Sadness/mood slump/mood swings	5 (33%)
Social withdrawal	3 (20%)
Extramucular symptoms	5/15 (33%)
Pulmonary restriction	2 (13%)
Pneumonia	1 (7%)
Cardial involvement	4 (27%)
Comorbidities	5/15 (33%)
Cystic fibrosis	1 (7%)
Factor-V-Leiden mutation	1 (7%)
Hypothyroidism	1 (7%)
Steatosis hepatitis	1 (7%)
HLA-B27 enthesitis	1 (7%)
Laboratory results	15/15 (100%)
Creatine kinase (CK) ↑	14 (93%)
Lactate dehydrogenase (LDH) ↑	11 (73%)
GOT ↑	11 (73%)
GPT ↑	7 (47%)
Serum antibodies	
Myositis-specific-antibodies (MSA)	6/12 (50%)
Anti-NXP-2	2 (17%)
Anti-PL-7	2 (17%)
Anti-Jo-1	2 (17%)
Myositis-associated-antibodies (MAA)	2/12 (17%)
Anti-Ro52	1 (8%)
PM75	1 (8%)
Antinuclear antibodies (ANA)	9/13 (69%)
Systemic Lupus erythematoses (SLE)	
Anti-double-stranded-DNA-antibodies (Anti-dsDNA)	1 (8%)
Smith-Antibodies (Anti-Sm/Sm-AK)	1 (8%)
Anti RNP/Sm-AK	2 (17%)

Table 1. Cont.

MRI skeletal muscle	11/15 (73%)
Normal	2 (18%)
Oedema	6 (54%)
Enhancement of contrast medium/signal alterations	4 (36%)
Compatible with myositis	8 (73%)
Musculoskeletal Ultrasound	9/15 (60%)
Oedema	3 (33%)
Enhancement of echogenicity/signal alterations	6 (67%)
Compatible with myositis	6 (67%)
Electromyography (EMG)	11/15 (73%)
Myopathic, compatible with myositis	8 (72%)
Unspecific sign	3 (27%)

3.2. Muscle Pathology

3.2.1. Muscle Pathology Score and Inflammatory Cell Invasion Are Highly Variable in All IIM Subtypes

Seven non-diseased control muscle biopsies showed no significant pathology and served as a morphological baseline for standard enzymatic and immunohistochemical studies and VAS score (Supplementary Table S6).

The muscle pathology (severity) score VAS showed a high heterogeneity in all subgroups with the highest score of 9 present in an anti-NXP-2-DM patient and in an anti-Jo-1-ASyS patient. There was no significant difference regarding the overall pathological severity score between DM, ASyS, and OM ($p = 0.8979$) (Figure 1B). Perifascicular atrophy and punched-out vacuoles (POV) were mainly seen in DM and anti-Jo-1-ASyS, whereas necrotic fibers, oedema, and regeneration were present in all IIMs. In two cases with OM, the VAS score was high (4–6) with many necrotic and regenerating fibers. P13, with the diagnosis of anti-NXP-2-DM, showed a weak pathology morphology in all sections, consistent with a mild clinical phenotype and normal CK levels (Figure 3, Table A1). Inflammatory cells were present in all IIM muscle specimens, presenting as mainly T-cells (CD3, CD8) and macrophages (CD68). B-cells (CD20) were present only in few cases of all subgroups (Figure 4, Table A2).

3.2.2. COX Deficient Fibers Are a Striking Pathology in DM Biopsies

Only in DM skeletal muscle biopsies, perifascicular COX-deficient fibers were detectable, albeit with a high variability from 0–3. COX-deficient fibers were absent in ASyS or OM cases (Table A1, Figure 3).

3.2.3. Perimysial Alkaline Phosphatase (ALP) Positivity Is Specific for Anti-Jo-1-ASyS

Alkaline phosphatase (ALP) positivity of fragmented perimysial tissue is a specific finding to discriminate ASyS cases from other IIM subtypes [41,52]. Strong perimysial staining with ALP was only present in two cases of anti-Jo-1-ASyS, but not in PL-7-ASyS or other IIM cases consistent with findings in adult patients [39] (Table A1, Figure 3).

3.2.4. Sarcolemmal Upregulation of MHC Class I, MHC Class II and Sarcolemmal Complement Deposits

MHC class I was strongly upregulated on the muscle fiber sarcolemma in almost every biopsy (14/15) of jIIM, confirming the diagnosis of myositis [53]. MHC1 showed a diffuse upregulation pattern in most cases with a perifascicular gradient of varying degree in the majority of DM and anti-Jo-1-ASyS. No perifascicular MHC class I upregulation was seen in OM and PL7-ASyS. MHC class II sarcolemmal upregulation was present in the majority of the cases but less strong with a scattered distribution in most cases, in line with previously shown results [53]. In two DM cases (P2, P12) with strong pathology, a perifascicular

staining pattern of MHC class II was more pronounced. Sarcolemmal deposits (C5b-9) on muscle fibers were present in 3/9 DM, 2/4 ASyS, and 1/2 OM with the strongest expression in an anti-Jo-1-ASyS, predominately in the perifascicular region (Table A2, Figures 4 and 5).

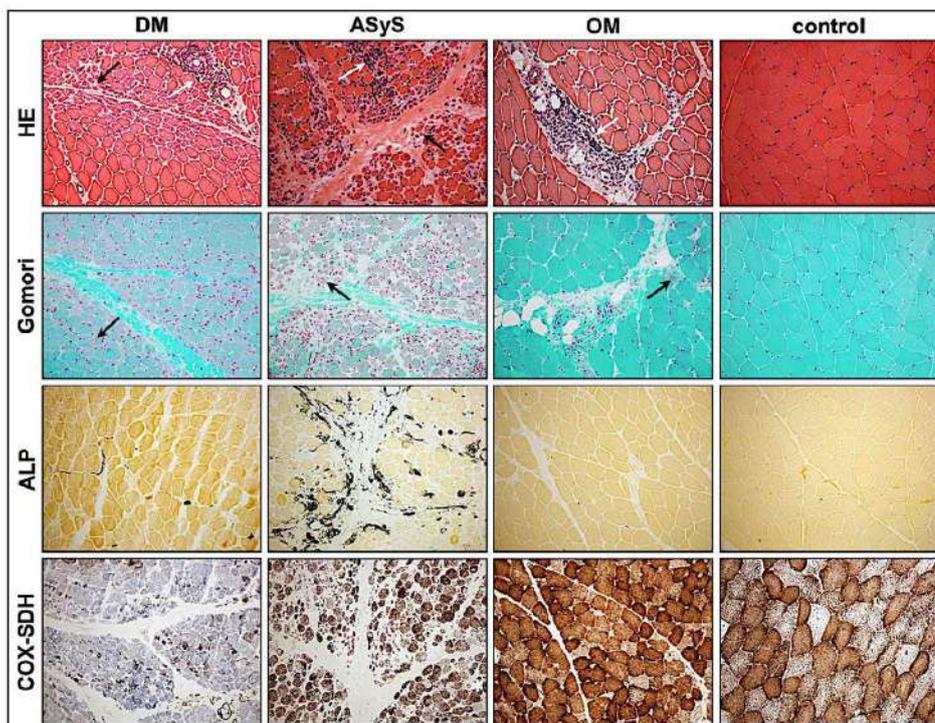


Figure 3. Representative staining of standard stained sections of jIIM from patients with DM (P4), anti-Jo1-ASyS (P14), OM (P3), and control. In H&E-stained sections, perifascicular atrophy (black arrows) is prominent in biopsies from patients with DM and anti-Jo1-ASyS. In OM, atrophic fibers are distributed throughout the section. Inflammatory cell infiltrates (white arrows) are mainly located perifascicularly in DM, perifascicularly in anti-Jo1-ASyS, and perimysial in OM sections. In Gomori trichrome, muscle fibers show a strong alteration of myofibrillar structures in DM and anti-Jo1-ASyS (arrows) but not in OM. ALP is highly upregulated (black) in the perimysium of anti-Jo1-ASyS and shows some subtle upregulation in DM but not in OM. COX-negative fibers appear blue in the COX-SDH staining with an exclusively high number of COX-deficient fibers in the DM sections (magnification 20×). (DM = dermatomyositis; ASyS = antisynthetase syndrome; OM = overlap myositis).

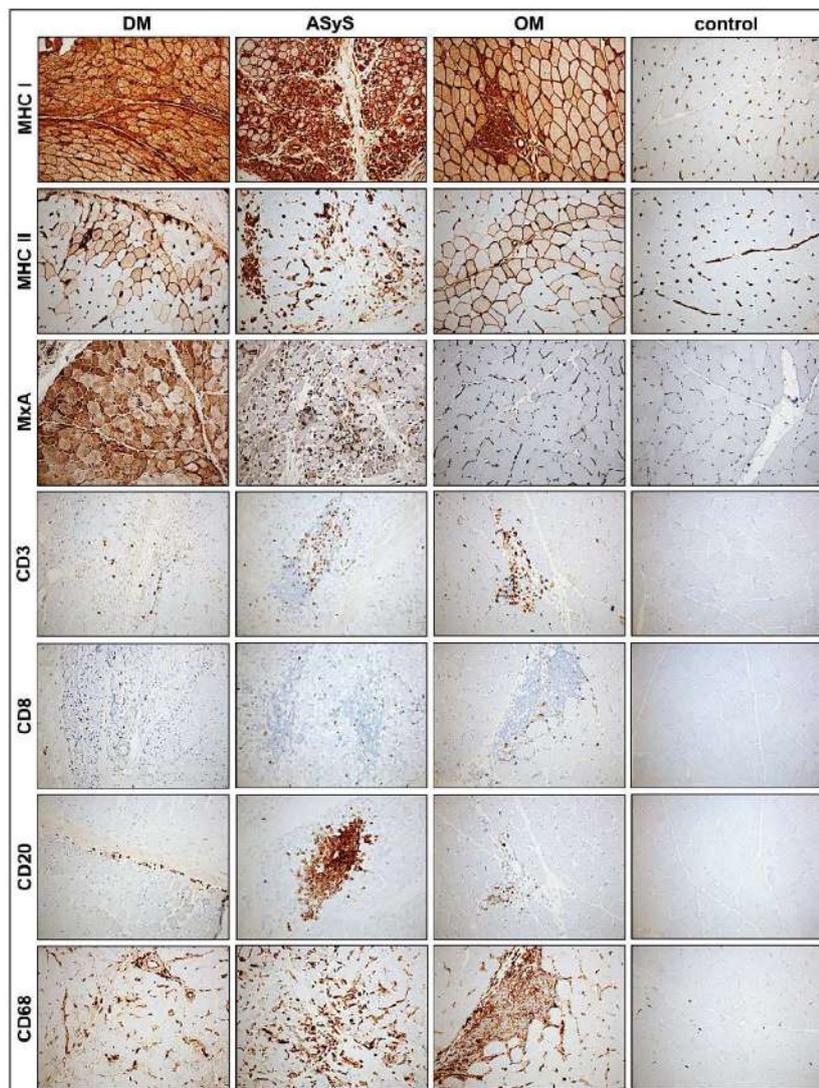


Figure 4. Representative staining of immunohistochemical features of biopsies from patients with DM (P4), anti-Jo1-ASyS (P14), OM (P3), and controls. The upregulation of MHC class 1 on muscle fibers is ubiquitously strong in all IIM subtypes, whereas MHC class II is mainly expressed at perifascicular muscle fibers. Upregulation of MxA is the highest in DM but also present in anti-Jo1-ASyS. Inflammatory cells occur in all subtypes, mainly T-lymphocytes (CD3, CD8). B-lymphocytes (CD20) are prominent in Jo-1-ASyS. Macrophages (CD68) are prominent in all subtypes (magnification 20×). (DM = dermatomyositis; ASyS = antisynthetase syndrome; OM = overlap myositis).

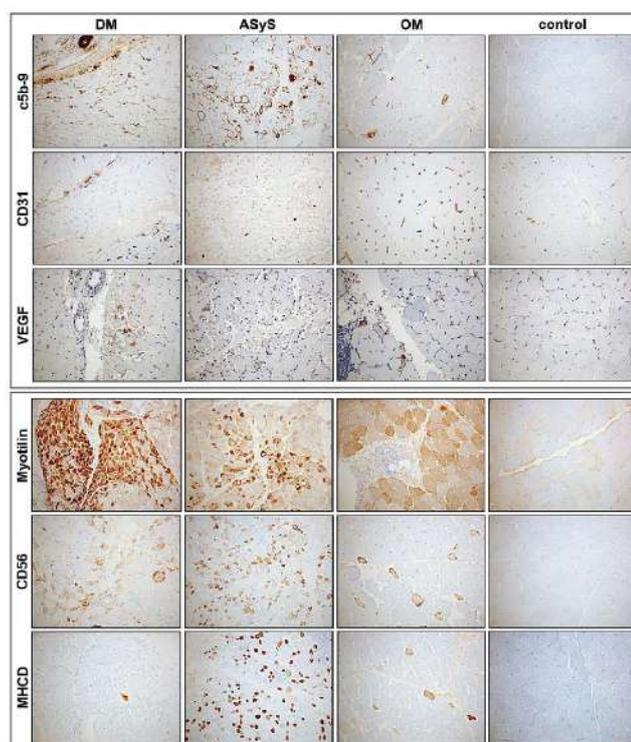


Figure 5. Representative stains of immunohistochemical features of biopsies from patients with DM (P4), anti-Jo1-ASyS (P14), OM (P3) and control. In DM, complement deposits (C5b-9) on endomysial capillaries are strong at the perifascicular region but can also be present in anti-Jo1-ASyS. Strong complement deposits on myofibers are present in anti-Jo1-ASyS in a perifascicular pattern. Few complement deposits are present on scattered fibers in OM. CD31⁺ endomysial capillaries are reduced in DM and anti-Jo1-ASyS. Focal reduction in CD31⁺ vessels is also present in OM. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) is mainly seen in DM but can also occur in anti-Jo1-ASyS and OM. Myotilin staining indicates a disorganization of sarcomeric structure. Strong perifascicular sarcomeric disruption is present in DM and less strong in anti-Jo1-ASyS. With antibodies against CD56 and MHCD, a strong regenerative capacity is seen in anti-Jo1-ASyS (magnification 20×). (DM = dermatomyositis; ASyS = antisynthetase syndrome; OM = overlap myositis).

3.2.5. Vascular Pathology and Upregulation of Proangiogenic Factor VEGF

Vascular pathology might contribute to muscle damage in jIIM. Strong complement deposits (C5b-9) were present on endomysial capillaries in DM (7/9) and anti-Jo1-ASyS (2/2), whereas no capillary deposits were detected in anti-PL7-ASyS and OM (Table A2, Figure 5). A reduction in CD31⁺ endomysial capillaries was more prominent in DM and anti-Jo1-ASyS compared to anti-PL7-ASyS and OM. The proangiogenic factor VEGF was upregulated with perifascicular distribution in DM and anti-Jo1-ASyS cases. Moderate rarefaction of CD31⁺ capillaries, and VEGF upregulation were also present in OM (Table A2, Figure 5).

3.2.6. Ultrastructural Pathology

Analyzing the muscle fiber at ultrastructural level shows disruption of myofibrillar architecture with a high variability in all subtypes (Table A3, Figure 6A–F). Mitochondria did show only mild pathology in few samples of IIM with subsarcolemmal aggregation, increased size in diameter (polymorphism), and disruption of cristae structure without any distinct differences between the subgroups (Table A3, Figure 6G–J). Analyses of three cases of ASyS revealed characteristic filamentous nuclear inclusions in 3/410 examined myonuclei, only in anti-Jo-1 ASyS (P14). Due to a section thickness of approximately 200 nm, the substructure of inclusion appeared slightly more homogenous, as compared to 60–100-nm sections. No nuclear inclusion was found in ASyS-PL-7 (P6, P9) (Table A3, Figure 6K–M).

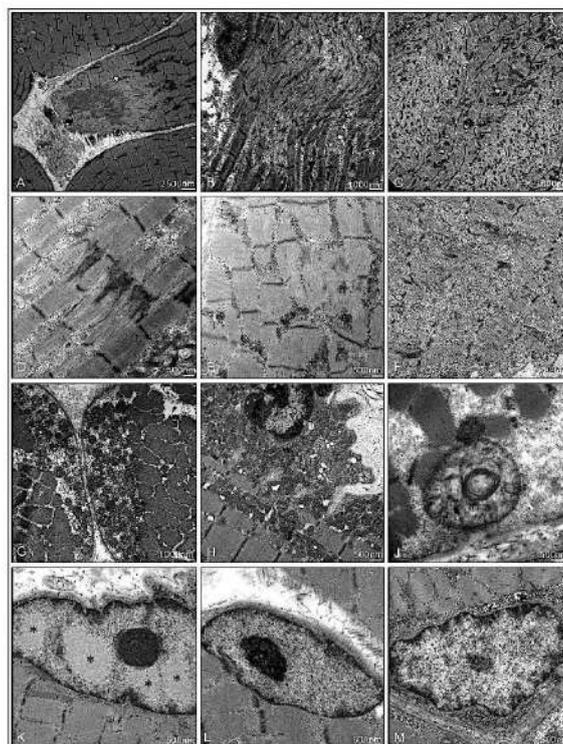


Figure 6. Ultrastructural pathology in muscle biopsies from patients with JIIM. A high variability of disruption of myofibrillar architecture can be present in all subtypes. Focal, core-like alterations of the sarcomeric architecture in DM (P10) (A), P4 (B), and P12 (C). Z-band alterations with Z-band streaming in P15 (D) and dissolving Z-bands in anti-Jo-1-ASyS (P14) (E) and focal glycogen deposits in OM (P7) (F). Moderate mitochondrial pathology with some mitochondrial subsarcolemmal aggregation in PL-7-ASyS (P9) (G) and DM (P2) (H). Few mitochondria with increased variability of diameter and altered cristae structure in P9 (I). Myonuclei with characteristic filamentous nuclear inclusions were only found in anti-Jo-1-ASyS (P14); note the different patterns of euchromatin, heterochromatin, and the nucleolus, as compared to the nuclear inclusions (*) (K). No inclusions were found in PL-7-ASyS (P6, P9) (L,M). (DM = dermatomyositis; ASyS = antisynthetase syndrome; OM = overlap myositis).

3.2.7. IFN 1 Surrogate Marker MxA Upregulation Correlates with Endothelial Inclusions

Myxovirus resistance protein A (MxA) is a type I-IFN-induced protein and serves as a diagnostic tool to discriminate DM from other IIM subtypes in juvenile and adults, which are at least equivalent in diagnostic performance compared to MHC class I staining [54]. In our study, MxA staining showed strong upregulation on the sarcolemma of myofibers and vessels with a perivascular predominance distribution in 8/9 patients with DM. The MxA expression correlated with the presence of endothelial tubuloreticular inclusions (TRIs) at TEM. In two patients with Jo-1-ASyS sarcoplasmic and vessel staining by MxA, an antibody was prominent, similar to those of the DM cases. TRIs were also frequent in one of the Jo-1-ASyS, and the only case of Jo-1-ASyS was available for TEM. No significant perivascular MxA upregulation or endothelial TRI were found in patients with anti-PL-7-ASyS (n = 2), OM (n = 2), or in the controls (n = 7). Only few scattered fibers with weak MxA upregulation were detected in P6 (anti-PL-7-ASyS) and P3 (OM) (Table A3, Figure 7).

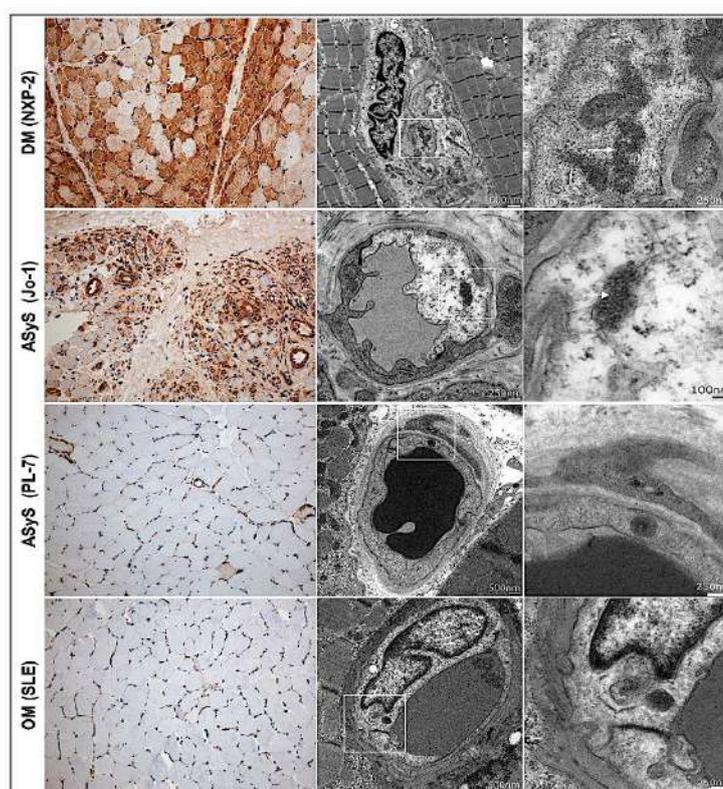


Figure 7. MxA upregulation and tubuloreticular inclusions in muscle biopsies from patients with IIM. Strong perivascular upregulation of interferon surrogate marker MxA in DM (P4) and anti-Jo-1 ASyS (P14) associated with tubuloreticular inclusions (TIR) in the endothelial cells of small vessels. Weak MxA upregulation on scattered myofibers with nonspecific osmiophilic inclusions in anti-PL7 ASyS (P6) and OM (P3) (magnification 20 \times) (DM = dermatomyositis; ASyS = antisynthetase syndrome; OM = overlap myositis).

3.2.8. Moderate Activation of Autophagy in jIIM

We analyzed the expression of the prototypic autophagy-related markers, p62 and LC3, in muscle biopsies from jIIM patients compared to controls. Few LC3 or p62-positive inclusions (rating from 0.5-1) were shown in 5/15 biopsies. In sections with a higher score (P12-score 8, P4-score 9, P14-score 9), LC3 expression was more pronounced. Additionally, in these cases, the muscle fiber regeneration (CD56, MHCD) was higher (Table A3, Figure 8).

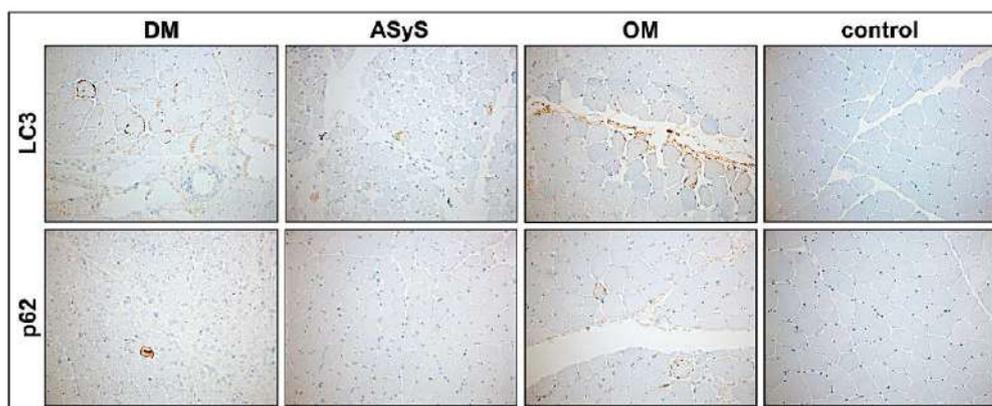


Figure 8. Expression of autopathic markers LC3 and p62 in jIIM muscle biopsies of patients with DM (P4), ASyS (P14), OM (P3), and control. Few muscle fibers expressing LC3 and p62 are present in DM (P4), ASyS (P14), and OM (P3), indicating a moderate upregulation of autophagy (magnification 20×). (DM = dermatomyositis; ASyS = antisynthetase syndrome; OM = overlap myositis).

3.2.9. Common Staining Pattern and Discriminative Key Findings in jIIM Subtypes

Comparing the detailed analysis of thirty-one parameters shows common and distinct features, which are helpful to discriminate the different jIIM subtypes from each other. Muscle biopsies from controls showed a normal staining serving as a baseline. Common features in all jIIM muscle biopsies included the upregulation of MHC class I, lympho-monocyte cell infiltrates, scattered muscle fiber necrosis, and myofiber regeneration. Mitochondrial pathology with COX-negative fibers were exclusively present in DM. Anti-Jo-1-AsyS, but not PL-7-AsyS, shared some common features with DM, including perifascicular MxA upregulation, rarefaction of CD31⁺ vessels and capillary C5b-9 deposits with endothelial inclusions (TIR), and punched-out vacuoles. Staining of the fragmented perimysium by ALP was present only in Jo-1-AsyS cases. Additional sarcolemmal C5b-9 deposits were more striking in Jo-1-AsyS. OM biopsies showed common morphological features of myositis, including with more scattered distribution compared to DM and anti-Jo-1-AsyS. Perifascicular atrophy can occur in OM, but without perifascicular upregulation of MHC class 1 or MxA (Figure 9A,B).

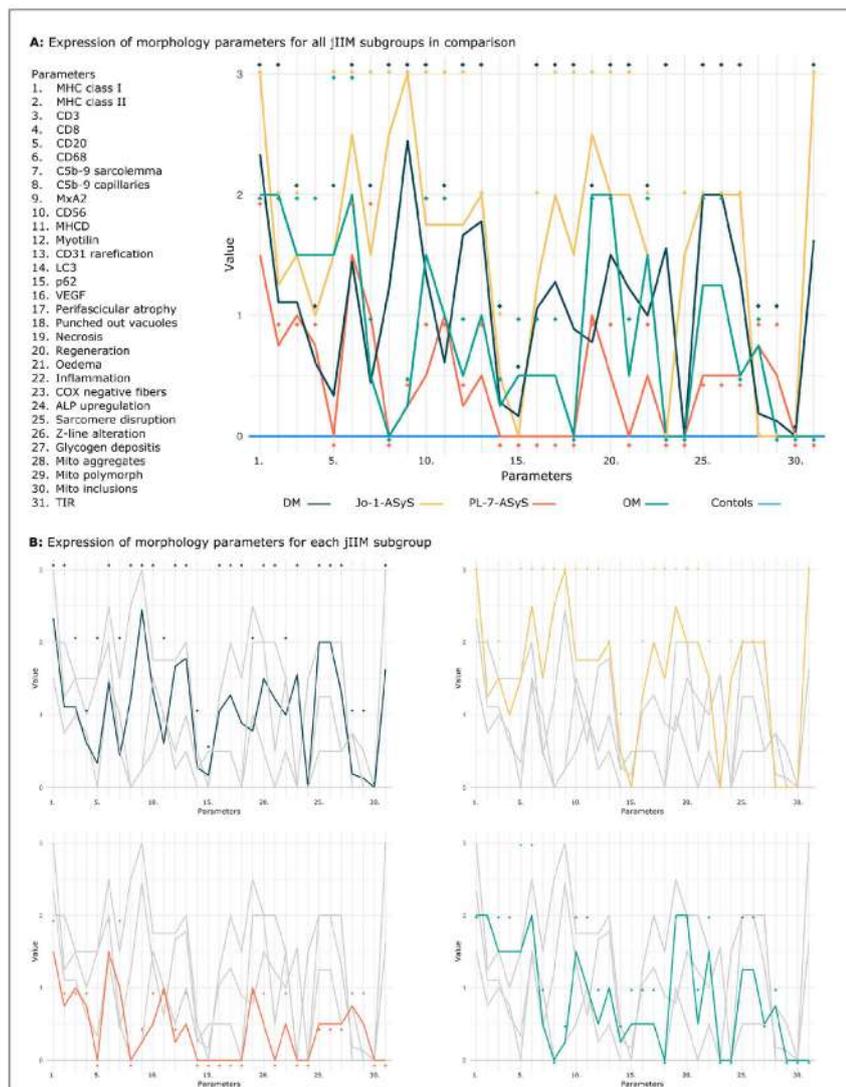


Figure 9. Visual exploration of the values. Common and discriminative morphological patterns in jIIM subgroups DM, ASyS, OM, and controls for 31 parameters, shown as mean (coloured lines) and maximum values (rhombus) per subgroup as an overview (A) and separated by subgroups (B). The minimum values per subgroup representing weak morphological characteristics are not shown. Healthy control (blue line) shows the normal pattern. Note the visible similar trend of the pattern of DM and Jo-1- ASyS compared to that in PL-7- ASyS and OM. For all parameters, the *p*-value did not reach statistical significance. (DM = dermatomyositis; ASyS = antisynthetase syndrome; OM = overlap myositis, TIR = tubuloreticular inclusions).

4. Discussion

The aim of this study was to analyze childhood myositis subtypes by using a comprehensive panel of stains that are widely available and recommended for diagnostic purposes in inflammatory myopathies [55]. This was carried out explicitly in a single tertiary center to avoid any confounders (including technical ones), and to gain full access to all additional data of the patients. Here, we describe that there are obvious and well-discernible morphological differences between DM and ASyS-associated myositis and overlap myositis in children. Those differences are well in line with current hypotheses about the different pathogenesis and the immune mechanisms involved in these entities. As we are approaching the era of targeted and individualized therapies, tailored according to the specific etiopathogenesis of diseases, it is of utmost importance to have a fine-tuned diagnostic repertoire that reflects immune pathogenesis in jIIM.

The juvenile patients enclosed in our study showed clinical signs of an IIM with the leading symptoms of subacute manifestation of proximal weakness and skin symptoms. The weakness was prevailing in the proximal lower legs with difficulties in climbing stairs. The diagnosis of jIIM was verified by MRI, EMG, and/or muscle ultrasound and laboratory data with an increased CK in the majority of patients. The distribution of age and gender with a higher proportion of affected females was in line with that of other studies [10,22]. Interestingly, in 33% of our young patients, sadness and mood swing were overt, which juxtaposes clinically reported signs of adult patients with IIM. Calcinosis, a skin symptom in jDM and uncommon in adult DM, was present in one third of our patients [24].

Compared to adults, the sub-classification of IIM in children is less well defined [3,4,6,54,56]. In our cohort, the majority of cases were diagnosed as DM, followed by ASyS and OM. MSA were analyzed in the majority of the patients, and in 50% of the patients, antibodies were detected, showing anti-NXP-2, anti-Jo1, and anti-PL-7 antibodies.

For morphological classification of juvenile IIM, only few studies were performed so far but without including all IIM subtypes and without using a specific and comprehensive myopathological repertoire of stains [33]. A common pathology in all of our juvenile IIM cases was the upregulation of MHC class 1 and MHC class 2, inflammation, oedema, necrotic fibers, and regeneration. Lympho-monocyte cell infiltrates were present in all subtypes. Compared to other studies, B-lymphocytes were not the predominant cell type in our DM cohort, but also occurred in Jo-1-ASyS and OM [57]. These analyses are mandatory to delineate IIM from hereditary myopathies. However, the staining alone does not discriminate between the distinct subtypes. Using detailed morphological analysis of thirtyone parameters showed a number of differences in staining patterns among the IIM subtypes.

Chronic disturbance in endothelial cell homeostasis, leading to a vasculopathy, is considered a major contributor to jDM, and markers of endothelial injury are increased in active jDM [58–60]. Severe vascular pathology predicts a chronic disease course and suggests poor prognostic factor in the outcome of jDM [60]. In muscle biopsies, a vasculopathy characterized by loss of endomysial vessels and hypoxia with upregulation of VEGF predominantly in perifascicular regions has been described with a strong heterogeneity in jDM patients [51].

Our data confirm the involvement of vascular pathology in jDM. A strong vasculopathy in jDM is associated with a reduced capillary network, capillary complement deposits, tubuloreticular endothelial inclusions, and upregulation of hypoxic marker (such as VEGF and strong muscle fiber pathology with disruption of the myofibrillar structure and hypoxia-driven pathology).

Vascular pathology was also present in anti-Jo-1-ASyS, leading to the hypothesis of a common pathway in pathogenesis compared to DM [39]. Vascular rarefaction and VEGF upregulation also occurred in OM cases. These findings lead to the hypothesis that vascular involvement might play a role in pathogenesis, in inflammatory myopathies other than DM.

Microvascular membrane attack complex deposits in dermatomyositis might result from activation of the classical complement pathway triggered by direct binding of C1q to injured endothelial cells [61]. In our cohort, capillary complement deposits (C5b-9)

were present in patients with jDM and anti-Jo-1-ASyS. Sarcolemmal complement deposits were present with strong perifascicular expression in anti-Jo-1-ASyS. This underlines the hypothesis that, in ASyS, complement decoration of myofibers is involved in interferon (IFN) γ -mediated myofiber damage in that specific area.

IFN-induced reactive oxygen species and mitochondrial damage contribute to muscle impairment and inflammation maintenance in dermatomyositis [62]. COX-deficient fibers are present in adult DM muscle samples with a variability different in MSA subgroups [56]. In our jIIM patients, COX-deficient fibers were exclusively present in DM muscles; thus, we can attach more importance to this staining for differentiating between certain subgroups. However, manifest mitochondrial ultrastructural alterations with formation of paracrystalline inclusions (as in monogenic mitochondriopathies or in IBM) were not seen.

Type I interferon (IFN) upregulation plays a key role in jIIM and inhibitory regulators of IFN, such as ISG15, as well as discriminated patients with DM from those with OM and inversely correlated with the severity of muscle pathology and positively with the clinical outcome [30]. The IFN surrogate marker, MxA, has a high specificity and sensitivity in DM cases and is recommended for muscle biopsy diagnosis by international consensus [54,63]. A perifascicular upregulation of MxA was seen in all of our jDM biopsies, with the exception of one case with an overall low pathology and sparse clinical symptoms. Strong MxA expression on muscle fibers and vessels was also present in one anti-Jo-1-ASyS case, but only weak or absent in anti-PL-7-ASyS. These data are in line with other studies, showing that MxA is expressed in a subset of ASyS cases. This suggests the possibility of common or overlapping pathological (type I and/or type II) interferon-related pathways in DM and ASyS, especially associated with anti-Jo1 antibodies [64]. This issue clearly warrants further detailed studies in the future. Endothelial inclusions (EIR) were also detected in the anti-Jo-1 ASyS, which is mainly a diagnostic criterion for DM, confirming this hypothesis.

In antisynthetase syndrome, our study highlighted the specific morphological features with perifascicular atrophy. As expected, the ALP staining pattern was strong in anti-Jo-1-ASyS and was not altered in other subgroups; thus, high sensitivity and specificity helps to distinguish ASyS from other myopathies, showing that ALP is a helpful diagnostic marker [39,52]. However, normal ALP staining does not exclude ASyS, but it is unlikely that it renders anti-Jo1-ASyS. The presence of filamentous nuclear inclusions are hallmarks of adult ASyS [41]. Only the specimen of an anti-Jo1-ASyS patient showed characteristic nuclear inclusions, whereas no nuclear inclusions were found in anti-PL-7-ASyS. From the data of our study, anti-Jo-1 and anti-PL-7-ASyS might have different pathological characteristics and should be further analyzed in larger cohorts.

In juvenile OM, the muscle pathology is not analyzed in detail so far. In our cohort, muscle pathology showed common features of IIM with MHC class I upregulation, inflammation, and oedema with a moderate pathology score. Tubuloreticular inclusions can occur in OM, especially in lupus erythematosus, but were not present in our cases [65,66]. MxA upregulation was weak on scattered fibers, but was not in a perifascicular distribution in OM, consistent with the upregulation of type I IFN in childhood SLE [18,67].

Autophagy is important for regulating homeostasis in cells. In skeletal and cardiac muscles, due to tension-induced force, misfolded proteins and damaged organelles are recycled by autophagic processes [68]. P62⁺ inclusion in myofibers are a nonspecific process following muscle injury, including myopathy and neurogenic atrophy, and is more prevalent in biopsies with more severe muscle damage [69]. In IIM, dysregulated or enhanced autophagy is described in IMNM and sIBM with distinct patterns of p62 inclusions and may play a role in the disease pathology [70]. In our study, the autophagic molecules, LC3 and p62, were visible only in few biopsies of DM, and anti-Jo-1-ASyS cases all showed higher scores of autophagy-related pathomorphology. This finding is consistent with an increased autophagy in more strongly affected muscle biopsies and awaits further detailed analysis in comparison to the adult situation.

For adults, a muscle biopsy to confirm the clinical diagnosis of myositis and characterize the myositis subtype is recommended by the German Neurological society, since a precise

diagnosis is crucial for the therapy regime. Our data suggest that certain subtypes of myositis also exist in juvenile patients. Because these subtypes are less well defined compared to adults, and since myositis specific antibodies are false positive or missing in about 20% of children, we recommend a muscle biopsy in all juvenile patients with clinical symptoms of myositis. A small biopsy (0.5 cm in diameter) is adequate to perform a large set of staining and electron microscopy. Additionally, studies of larger cohorts are necessary to improve understanding on the underlying aetiopathology of juvenile myositis and therapy options.

5. Limitations

This study has some limitations. First, the clinical data from the patients were collected retrospectively. Therefore, MSA were not available for every patient in our cohort. Second, this is a single-center study which has certain advantages; however, the cohort of patients with such rare diseases is small, especially since the group of OM was diagnosed only in two patients with SLE. Therefore, the small sample size reduces the statistical power and the ability to formally identify significant effects in the cohort. Nevertheless, the described and visualized morphological and morphometric patterns of the subgroups provided very useful trajectories to define diagnostic and classification criteria.

6. Conclusions

Our study demonstrates the need of detailed and distinct morphological characterization of muscle pathology in juvenile myositis, with respect to precise prognostic and therapeutic decisions in jIIM, especially in children with negative or absent serological findings.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11010109/s1>. Supplemental data. Table S1: Antibodies for IHC stains, Table S2: Detailed clinical data of patients with jIIM. Table S3: Laboratory data of patients with jIIM, Table S4: Electromyography, skeletal MRI and muscle ultrasound of patients with jIIM, Table S5: Morphology analysis of muscle biopsies from controls.

Author Contributions: Conceptualization, A.S. and W.S.; methodology, A.S., W.S., C.D., I.D., C.P. validation, A.S., W.S., H.-H.G.; investigation, L.R., A.H., writing—original draft preparation, A.S., W.S., C.P.; writing—review and editing, A.S., W.S., I.D., C.D., C.P., A.H., H.-H.G., A.D.M.; visualization, L.R., I.D.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Justus Liebig University Giessen, Germany (protocol code AZ07/09, AZ 258/16).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are available at supplemental data.

Acknowledgments: We thank the patients contributing to this study and Hannah Schlierbach, Angela Roth, Cordula zum Bruch and Kerstin Leib for their excellent technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ANA = antinuclear antibodies; AP = alkaline phosphatase; ASyS = anti-synthetase syndrome; CK = creatine kinase; COX = cytochrome oxidase; DM = dermatomyositis; IIM = idiopathic inflammatory myopathy; MxA = myxovirus resistance protein A; MSA = myositis specific antibodies; MAA = myositis-associated antibodies; MHC class 1 = major histocompatibility factor class 1; OM = overlap myositis; SLE = systemic lupus erythematosus; SDH = succinate dehydrogenase; TEM = Transmission electron microscopy; TRI = tubuloreticular inclusions; VEGF = vascular endothelial growth factor.

Appendix A

Table A1. Scoring of muscle pathology at standard staining.

Diagnosis	VAS-Score	HE						COX-SDH	ALP
		Perifascicular Atrophy (PA)	Punched-Out-Vacuoles (POV)	Necrosis	Regeneration	Oedema	Inflammation	COX-Negative Fibers	Upregulation
P1 DM	4	1	0	1	2	1	1	2	0
P2 DM	6	3	1	0	3	1	1	3	0
P5 DM	6	1	3	1	1	3	2	3	0
P10 DM	4	0.5	0	1	1	1	1	0.5	0
P11 DM	1	0	0	0	0	0	0.5	0	0
P12 DM	8	3	1	2	3	2	2	3	0
P15 DM	2	0	0	1	0.5	1	0.5	0	0
P4 (NXP-2) DM	9	3	3	1	3	2	1	3	0
P13 (NXP-2) DM	1	0	0	0	0	0	0.5	0	0
P8 ASyS (Jo-1)	4	1	0	2	1	1	1	0	1
P14 ASyS (Jo-1)	9	3	3	3	3	3	2	0	2
P6 ASyS (PL-7)	2	0	0	1	0	0	1	0	0
P9 ASyS (PL-7)	2	0	0	1	1	0	0	0	0
P3 OM (SLE)	4	1	0	2	2	0	1	0	0
P7 OM (SLE)	6	0	0	2	2	1	2	0	0

DM = dermatomyositis; ASyS = antisynthetase syndrome; OM = overlap myositis; SLE = systemic lupus erythematosus.

Table A2. Scoring of muscle pathology at IH staining.

Diagnosis	Inflammation and Immunoactivation						Complement Deposits (C5b-9)		MxA	Regeneration	Sarcomere Disruption	Angiogenesis		Autophagy		
	MHC1	MHC2	CD3	CD8	CD20	CD68	Sarco-Lemma	Capillaries				CD36	MHCd	Myo-Titin	CD31 Loss	VEGF
P1 DM	2	1	1	1	0	1	2	2	3	2	0	1	1	1	0	0
P2 DM	2	1	1	1	0	1	1	0	3	1	1	2	2	2	0	0
P5 DM	3	0.5	2	1	2	3	0	1	3	3	2	3	2	3	0.5	0.5
P10 DM	3	3	2	1	0	1	0	3	2	0	0	2	2	1	0	0
P11 DM	2	0	0.5	0	0	1	0	0.5	2	0	0	0	1	0	0	0
P12 DM	3	2	1	0	0	2	0	0.5	3	2	2	3	3	2	1	0.5
P15 DM	3	0.5	0.5	0.5	0	1	0	2	3	1	0	2	1	0	0	0
P4 (NXP-2) DM	3	2	2	1	1	2	1	2	3	3	0.5	2	3	0.5	1	0.5
P13 (NXP-2) DM	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
P8 ASyS (Jo-1)	3	0.5	1	1	0	2	0	3	3	0.5	0.5	0.5	2	0.5	0	0
P14 ASyS (Jo-1)	3	2	2	1	3	3	3	2	3	3	3	3	2	2	1	0
P6 ASyS (PL-7)	2	0.5	1	1	0	2	2	0	0.5	0	1	0	1	0	0	0
P9 ASyS (PL-7)	1	1	1	0.5	0	1	0	0	0	1	1	0.5	0	0	0	0
P3 OM (SLE)	2	2	2	2	3	3	1	0	0.5	2	2	1	1	1	0.5	1
P7 OM (SLE)	2	2	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0

DM = dermatomyositis; ASyS = antisynthetase syndrome; OM = overlap myositis; SLE = systemic lupus erythematosus.

Table A3. Scoring of muscle pathology at ultrastructural level.

Diagnosis	Myofibrillar Structure			Mitochondria			Endomysial Capillaries	Nuclear Inclusions
	Sarcomere Structure Disruption	Z-Line Alteration	Glycogen Deposits	Aggregation	Polymorphism	Inclusions	Tubuloreticular Structures (TIR)	
P1 DM	1	1	2	1	1	0	2 (3/10)	n.a.
P2 DM	3	3	0	0.5	0	0	2 (4/10)	n.a.
P5 DM				n.a.				
P10 DM	2	2	2	0	0	0	1 (2/10)	n.a.
P11 DM	1	1	3	0	0	0	3 (6/10)	n.a.
P12 DM	3	3	0.5	0	0	0	1 (2/10)	n.a.
P15 DM	3	3	2	0	0	0	1 (2/10)	n.a.
P4 DM (NXP-2)	3	3	1	0	0	0	3 (8/10)	n.a.
P13 DM (NXP-2)	0	0	0	0	0	0	0 (0/10)	n.a.
P8 ASyS (jo-1)				n.a.				
P14 ASyS (jo-1)	2	2	2	0	0	0	3 (3/5)	3/410
P6 ASyS (PL-7)	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0 (0/10)	0/205
P9 ASyS (PL-7)	0.5	0.5	0.5	1	1	0	0 (0/10)	0/210
P3 OM (SLE)	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0 (0/10)	n.a.
P7 OM (SLE)	2	2	0.5	1	0	0	0 (0/10)	n.a.

n.a. = not analyzed; DM = dermatomyositis; ASyS = antisynthetase syndrome; OM = overlap myositis; SLE = systemic lupus erythematosus.

References

- Ladislau, L.; Suarez-Calvet, X.; Toquet, S.; Landon-Cardinal, O.; Amelin, D.; Depp, M.; Rodero, M.P.; Hathazi, D.; Duffy, D.; Bondet, V.; et al. JAK inhibitor improves type I interferon induced damage: Proof of concept in dermatomyositis. *Brain* **2018**, *141*, 1609–1621. [\[CrossRef\]](#)
- Melki, I.; Devilliers, H.; Gitiaux, C.; Bondet, V.; Belot, A.; Bodemer, C.; Quartier, P.; Crow, Y.J.; Duffy, D.; Rodero, M.P.; et al. Circulating Interferon- α Measured With a Highly Sensitive Assay as a Biomarker for Juvenile Inflammatory Myositis Activity: Comment on the Article by Mathian et al. *Arthritis Rheumatol.* **2020**, *72*, 195–197. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Allenbach, Y.; Benveniste, O.; Goebel, H.H.; Stenzel, W. Integrated classification of inflammatory myopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2017**, *43*, 62–81. [\[CrossRef\]](#)
- De Bleecker, J.L.; De Paepe, B.; Aronica, E.; de Visser, M.; Amato, A.; Benveniste, O.; De Bleecker, J.; de Boer, O.; Dimachkie, M.; Cherardi, R.; et al. 205th ENMC International Workshop: Pathology diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies part II, 28–30 March 2014, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord.* **2015**, *25*, 268–272. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mariampillai, K.; Granger, B.; Amelin, D.; Guiguet, M.; Hachulla, E.; Maurier, F.; Meyer, A.; Tohme, A.; Charuel, J.L.; Musset, L.; et al. Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. *JAMA Neurol.* **2018**, *75*, 1528–1537. [\[CrossRef\]](#)
- Tanboon, J.; Uruha, A.; Stenzel, W.; Nishino, I. Where are we moving in the classification of idiopathic inflammatory myopathies? *Curr. Opin. Neurol.* **2020**, *33*, 590–603. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Siegert, E.; Uruha, A.; Goebel, H.H.; Preuß, C.; Casteleyn, V.; Kleefeld, F.; Alten, R.; Burmester, G.R.; Schneider, U.; Höppner, J.; et al. Systemic sclerosis-associated myositis features minimal inflammation and characteristic capillary pathology. *Acta Neuropathol.* **2021**, *141*, 917–927. [\[CrossRef\]](#)
- Fredi, M.; Cavazzana, I.; Franceschini, F. The clinico-serological spectrum of overlap myositis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2018**, *30*, 637–643. [\[CrossRef\]](#)
- Patwardhan, A.; Spencer, C.H. Biologics in refractory idiopathic inflammatory myositis (IIM): What experience in juvenile vs adult myositis tells us about the use of biologics in pediatric IIM. *Mod. Rheumatol.* **2021**, *31*, 933–948. [\[CrossRef\]](#)
- Rider, L.G.; Nistala, K. The juvenile idiopathic inflammatory myopathies: Pathogenesis, clinical and autoantibody phenotypes, and outcomes. *J. Intern. Med.* **2016**, *280*, 24–38. [\[CrossRef\]](#)
- Shah, M.; Mamyrova, G.; Targoff, I.N.; Huber, A.M.; Malley, J.D.; Rice, M.M.; Miller, F.W.; Rider, L.G. The clinical phenotypes of the juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Medicine* **2013**, *92*, 25–41. [\[CrossRef\]](#)
- Bottai, M.; Tjärnlund, A.; Santoni, G.; Werth, V.P.; Pilkington, C.; de Visser, M.; Alfredsson, L.; Amato, A.A.; Barohn, R.J.; Liang, M.H.; et al. EULAR/ACR classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups: A methodology report. *RMD Open* **2017**, *3*, e000507. [\[CrossRef\]](#)
- Rider, L.G.; Shah, M.; Mamyrova, G.; Huber, A.M.; Rice, M.M.; Targoff, I.N.; Miller, F.W. The myositis autoantibody phenotypes of the juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Medicine* **2013**, *92*, 223–243. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ueki, M.; Kobayashi, I.; Takezaki, S.; Tozawa, Y.; Okura, Y.; Yamada, M.; Kuwana, M.; Ariga, T. Myositis-specific autoantibodies in Japanese patients with juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Mod. Rheumatol.* **2019**, *29*, 351–356. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Yamasaki, Y.; Kobayashi, N.; Akioka, S.; Yamazaki, K.; Takezaki, S.; Nakaseko, H.; Ohara, A.; Nishimura, K.; Nishida, Y.; Sato, S.; et al. Clinical impact of myositis-specific autoantibodies on long-term prognosis of juvenile idiopathic inflammatory myopathies: Multicenter study. *Rheumatology* **2021**, *60*, 4821–4831. [\[CrossRef\]](#)
- Betteridge, Z.E.; McHugh, N.J. Myositis-specific autoantibodies: An important tool to support diagnosis of myositis. *J. Intern. Med.* **2016**, *280*, 8–23. [\[CrossRef\]](#)
- Bitencourt, N.; Solow, E.B.; Wright, T.; Bernas, B.L. Inflammatory myositis in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **2020**, *29*, 776–781. [\[CrossRef\]](#)
- Turnier, J.L.; Pachman, L.M.; Lowe, L.; Tsoi, L.C.; Elhaj, S.; Menon, R.; Amoruso, M.C.; Morgan, G.A.; Gudjonsson, J.E.; Berthier, C.C.; et al. Comparison of Lesional Juvenile Myositis and Lupus Skin Reveals Overlapping Yet Unique Disease Pathophysiology. *Arthritis Rheumatol.* **2020**, *73*, 1062–1072. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kim, H.; Gunter-Rahman, F.; McGrath, J.A.; Lee, E.; de Jesus, A.A.; Targoff, I.N.; Huang, Y.; O'Hanlon, T.P.; Tsay, W.L.; Gadina, M.; et al. Expression of interferon-regulated genes in juvenile dermatomyositis versus Mendelian autoinflammatory interferonopathies. *Arthritis Res. Ther.* **2020**, *6*, 69. [\[CrossRef\]](#)
- Kim, H.; Sanchez, G.A.; Goldbach-Mansky, R. Insights from Mendelian Interferonopathies: Comparison of CANDIE, SAVI with AGS, Monogenic Lupus. *J. Mol. Med.* **2016**, *94*, 1111–1127. [\[CrossRef\]](#)
- Meyer, A.; Meyer, N.; Schaeffer, M.; Gottenberg, J.E.; Gery, B.; Sibilia, J. Incidence and prevalence of inflammatory myopathies: A systematic review. *Rheumatology* **2015**, *54*, 50–63. [\[CrossRef\]](#)
- Tansley, S.L.; McHugh, N.J.; Wedderburn, L.R. Adult and juvenile dermatomyositis: Are the distinct clinical features explained by our current understanding of serological subgroups and pathogenic mechanisms? *Arthritis Res. Ther.* **2013**, *15*, 211. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wienke, J.; Deakin, C.T.; Wedderburn, L.R.; van Wijk, F.; van Royen-Kerkhof, A. Systemic and Tissue Inflammation in Juvenile Dermatomyositis: From Pathogenesis to the Quest for Monitoring Tools. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2951. [\[CrossRef\]](#)

24. Marhaug, G.; Shah, V.; Shroff, R.; Varsani, H.; Wedderburn, L.R.; Pilkington, C.A.; Brogan, P.A. Age-dependent inhibition of ectopic calcification: A possible role for fetuin-A and osteopontin in patients with juvenile dermatomyositis with calcinosis. *Rheumatology* **2008**, *47*, 1031–1037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sag, E.; Demir, S.; Bilginer, Y.; Talim, B.; Haliloglu, G.; Topaloglu, H.; Ozen, S. Clinical features, muscle biopsy scores, myositis specific antibody profiles and outcome in juvenile dermatomyositis. *Semin. Arthritis Rheum.* **2021**, *51*, 95–100. [[CrossRef](#)]
26. Nguyen, M.; Do, V.; Yell, P.C.; Jo, C.; Liu, J.; Burns, D.K.; Wright, T.; Cai, C. Distinct tissue injury patterns in juvenile dermatomyositis auto-antibody subgroups. *Acta Neuropathol. Commun.* **2020**, *8*, 125. [[CrossRef](#)]
27. Li, L.; Liu, C.; Cheng, L.; Yan, S.; Chen, H.; Li, Y. Assessment of diagnostic utility, clinical phenotypic associations, and prognostic significance of anti-NXP2 autoantibody in patients with idiopathic inflammatory myopathies: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Rheumatol.* **2021**, *40*, 819–832. [[CrossRef](#)]
28. Sanner, H.; Sjaastad, I.; Plato, B. Disease activity and prognostic factors in juvenile dermatomyositis: A long-term follow-up study applying the Paediatric Rheumatology International Trials Organization criteria for inactive disease and the myositis disease activity assessment tool. *Rheumatology* **2014**, *53*, 1578–1585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Bolko, L.; Jiang, W.; Tawara, N.; Landon-Cardinal, O.; Anquetil, C.; Benveniste, O.; Allenbach, Y. The role of interferons type I, II and III in myositis: A review. *Brain Pathol.* **2021**, *31*, e12955. [[CrossRef](#)]
30. Hou, C.; Durrleman, C.; Periou, B.; Barnerias, C.; Bodemer, C.; Desguerre, I.; Quartier, P.; Melki, I.; Rice, G.I.; Rodero, M.P.; et al. From Diagnosis to Prognosis: Revisiting the Meaning of Muscle ISG15 Overexpression in Juvenile Inflammatory Myopathies. *Arthritis Rheumatol.* **2021**, *73*, 1044–1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Allenbach, Y.; Leroux, G.; Suarez-Calvet, X.; Preusse, C.; Gallardo, E.; Hervier, B.; Rigolet, A.; Hie, M.; Pehl, D.; Lima, N.; et al. Dermatomyositis With or Without Anti-Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Antibodies: Common Interferon Signature but Distinct NOS2 Expression. *Am. J. Pathol.* **2016**, *186*, 691–700. [[CrossRef](#)]
32. Hida, A.; Yamashita, T.; Hosono, Y.; Inoue, M.; Kaida, K.; Kadoya, M.; Miwa, Y.; Yajima, N.; Maezawa, R.; Arai, S.; et al. Anti-TIF1-gamma antibody and cancer-associated myositis: A clinicohistopathologic study. *Neurology* **2016**, *87*, 299–308. [[CrossRef](#)]
33. Yasin, S.A.; Schutz, P.W.; Deakin, C.T.; Sag, E.; Varsani, H.; Simou, S.; Marshall, L.R.; Tansley, S.L.; McHugh, N.J.; Holton, J.L.; et al. Histological heterogeneity in a large clinical cohort of juvenile idiopathic inflammatory myopathy: Analysis by myositis autoantibody and pathological features. *Neuropathol. Applied. Neurobiol.* **2019**, *45*, 495–512. [[CrossRef](#)]
34. Noguchi, E.; Uruba, A.; Suzuki, S.; Hamanaka, K.; Ohnuki, Y.; Tsugawa, J.; Watanabe, Y.; Nakahara, J.; Shiina, T.; Suzuki, N.; et al. Skeletal Muscle Involvement in Antisynthetase Syndrome. *JAMA Neurol.* **2017**, *74*, 992–999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hervier, B.; Benveniste, O. Clinical heterogeneity and outcomes of antisynthetase syndrome. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2013**, *15*, 349. [[CrossRef](#)]
36. Gallay, L.; Gayed, C.; Hervier, B. Antisynthetase syndrome pathogenesis: Knowledge and uncertainties. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2018**, *30*, 664–673. [[CrossRef](#)]
37. Gunawardena, H.; Betteridge, Z.E.; McHugh, N.J. Myositis-specific autoantibodies: Their clinical and pathogenic significance in disease expression. *Rheumatology* **2009**, *48*, 607–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Rider, L.G.; Miller, F.W.; Targoff, I.N.; Sherry, D.D.; Samayoa, E.; Lindahl, M.; Wener, M.H.; Pachman, L.M.; Plotz, P.H. A broadened spectrum of juvenile myositis. Myositis-specific autoantibodies in children. *Arthritis Rheum.* **1994**, *37*, 1534–1538. [[CrossRef](#)]
39. Mescam-Mancini, L.; Allenbach, Y.; Hervier, B.; Devilliers, H.; Mariampillay, K.; Dubourg, O.; Maisonobe, T.; Gherardi, R.; Meziri, P.; Preusse, C.; et al. Anti-Jo-1 antibody-positive patients show a characteristic necrotizing perifascicular myositis. *Brain* **2015**, *138*, 2485–2492. [[CrossRef](#)]
40. Uruba, A.; Suzuki, S.; Suzuki, N.; Nishino, I. Perifascicular necrosis in anti-synthetase syndrome beyond anti-Jo-1. *Brain* **2016**, *139*, e50. [[CrossRef](#)]
41. Stenzel, W.; Preuße, C.; Allenbach, Y.; Pehl, D.; Junckerstorff, R.; Heppner, F.L.; Nolte, K.; Aronica, E.; Kana, V.; Rushing, E.; et al. Nuclear actin aggregation is a hallmark of anti-synthetase syndrome-induced dysimmune myopathy. *Neurology* **2015**, *84*, 1346–1354. [[CrossRef](#)]
42. Allenbach, Y.; Benveniste, O.; Stenzel, W.; Boyer, O. Immune-mediated necrotizing myopathy: Clinical features and pathogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2020**, *16*, 689–701. [[CrossRef](#)]
43. Mohassel, P.; Foley, A.R.; Donkervoort, S.; Fequiere, P.R.; Pak, K.; Bönnemann, C.G.; Mammen, A.L. Anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase necrotizing myopathy masquerading as a muscular dystrophy in a child. *Muscle Nerve* **2017**, *56*, 1177–1181. [[CrossRef](#)]
44. Tansley, S.L.; Betteridge, Z.E.; Simou, S.; Jacques, T.S.; Pilkington, C.; Wood, M.; Warrior, K.; Wedderburn, L.R.; McHugh, N.J. Anti-HMGCR Autoantibodies in Juvenile Idiopathic Inflammatory Myopathies Identify a Rare but Clinically Important Subset of Patients. *J. Rheumatol.* **2017**, *44*, 488–492. [[CrossRef](#)]
45. Kishi, T.; Rider, L.G.; Pak, K.; Barillas-Arias, L.; Henrickson, M.; McCarthy, P.L.; Shaham, B.; Weiss, P.P.; Horkayne-Szakaly, I.; Targoff, I.N.; et al. Association of Anti-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase Autoantibodies With DRB1*07:01 and Severe Myositis in Juvenile Myositis Patients. *Arthritis Care Res.* **2017**, *69*, 1088–1094. [[CrossRef](#)]
46. Dubowitz, V.; Sewry, C.A.; Oldfords, A. *Muscle Biopsy: A Practical Approach*, 5th ed.; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, 2021.

47. Wedderburn, L.R.; Varsani, H.; Li, C.K.; Newton, K.R.; Amato, A.A.; Banwell, B.; Bove, K.E.; Corse, A.M.; Emslie-Smith, A.; Harding, B.; et al. International consensus on a proposed score system for muscle biopsy evaluation in patients with juvenile dermatomyositis: A tool for potential use in clinical trials. *Arthritis Rheum.* **2007**, *57*, 1192–1201. [[CrossRef](#)]
48. Varsani, H.; Charman, S.C.; Li, C.K.; Marie, S.K.; Amato, A.A.; Banwell, B.; Bove, K.E.; Corse, A.M.; Emslie-Smith, A.M.; Jacques, T.S.; et al. Validation of a score tool for measurement of histological severity in juvenile dermatomyositis and association with clinical severity of disease. *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, *74*, 204–210. [[CrossRef](#)]
49. Kölbl, H.; Preuß, C.; Brand, L.; von Moers, A.; Della Marina, A.; Schuelke, M.; Roos, A.; Goebel, H.H.; Schara-Schmidt, U.; Stenzel, W. Inflammation, fibrosis and skeletal muscle regeneration in LGMDR9 are orchestrated by macrophages. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2021**, *47*, 856–866. [[CrossRef](#)]
50. Aschman, T.; Schneider, J.; Grœuel, S.; Meinhardt, J.; Streit, S.; Goebel, H.H.; Büttnerova, I.; Elezkurtaj, S.; Scheibe, F.; Radke, J.; et al. Association Between SARS-CoV-2 Infection and Immune-Mediated Myopathy in Patients Who Have Died. *JAMA Neurol.* **2021**, *78*, 948–960. [[CrossRef](#)]
51. Preusse, C.; Allenbach, Y.; Hoffmann, O.; Goebel, H.H.; Pehl, D.; Radke, J.; Doerer, A.; Schneider, U.; Alten, R.H.; Kallinich, T.; et al. Differential roles of hypoxia and innate immunity in juvenile and adult dermatomyositis. *Acta Neuropathol. Commun.* **2016**, *4*, 45. [[CrossRef](#)]
52. Mozaffar, T.; Pestronk, A. Myopathy with anti-Jo-1 antibodies: Pathology in perimysium and neighbouring muscle fibres. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2000**, *68*, 472–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Sallum, A.M.; Kiss, M.H.; Silva, C.A.; Wakamatsu, A.; Sachetti, S.; Lotufo, S.; Matsumura, N.; Marie, S.K. MHC class I and II expression in juvenile dermatomyositis skeletal muscle. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2009**, *27*, 519–526.
54. Soponkanaporn, S.; Deakin, C.T.; Schutz, P.W.; Marshall, L.R.; Yasin, S.A.; Johnson, C.M.; Sag, E.; Tansley, S.L.; McHugh, N.J.; Wedderburn, L.R.; et al. Expression of myxovirus-resistance protein A: A possible marker of muscle disease activity and autoantibody specificities in juvenile dermatomyositis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2019**, *45*, 410–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Udd, B.; Stenzel, W.; Oldfors, A.; Olivé, M.; Romero, N.; Lammens, M.; Kusters, B.; Sewry, C.; Goebel, H.H.; Evangelista, T. 1st ENMC European meeting: The EURO-NMD pathology working group Recommended Standards for Muscle Pathology Amsterdam, The Netherlands, 7 December 2018. *Neuromuscul. Disord.* **2019**, *29*, 483–485. [[CrossRef](#)]
56. Benveniste, O.; Goebel, H.-H.; Stenzel, W. Biomarkers in Inflammatory Myopathies—An Expanded Definition. *Front. Neurol.* **2019**, *10*, 554. [[CrossRef](#)]
57. Sag, E.; Kale, G.; Haliloglu, G.; Bilginer, Y.; Akcoren, Z.; Orhan, D.; Gucer, S.; Topaloglu, H.; Ozen, S.; Talim, B. Inflammatory milieu of muscle biopsies in juvenile dermatomyositis. *Rheumatol. Int.* **2021**, *41*, 77–85. [[CrossRef](#)]
58. Baumann, M.; Gumpold, C.; Mueller-Felber, W.; Schoser, B.; Haberler, C.; Loescher, W.N.; Rostasy, K.; Fischer, M.B.; Wanschitz, J.V. Pattern of myogenesis and vascular repair in early and advanced lesions of juvenile dermatomyositis. *Neuromuscul. Disord.* **2018**, *28*, 973–985. [[CrossRef](#)]
59. Gitiaux, C.; De Antonio, M.; Aouizerate, J.; Gherardi, R.K.; Guilbert, T.; Barnerias, C.; Bodemer, C.; Brochard-Payet, K.; Quartier, P.; Musset, L.; et al. Vasculopathy-related clinical and pathological features are associated with severe juvenile dermatomyositis. *Rheumatology* **2016**, *55*, 470–479. [[CrossRef](#)]
60. Papadopoulou, C.; Hong, Y.; Krol, P.; Al Obaidi, M.; Pilkington, C.; Wedderburn, L.R.; Brogan, P.A.; Eleftheriou, D. The Vasculopathy of Juvenile Dermatomyositis: Endothelial injury, hypercoagulability, and increased arterial stiffness. *Arthritis Rheumatol.* **2021**, *73*, 1253–1266. [[CrossRef](#)]
61. Lahoria, R.; Selcen, D.; Engel, A.G. Microvascular alterations and the role of complement in dermatomyositis. *Brain* **2016**, *139*, 1891–1903. [[CrossRef](#)]
62. Meyer, A.; Lavemy, G.; Allenbach, Y.; Grelet, E.; Ueberschlag, V.; Echaniz-Laguna, A.; Lannes, B.; Alsaleh, G.; Charles, A.L.; Singh, F.; et al. IFN-beta-induced reactive oxygen species and mitochondrial damage contribute to muscle impairment and inflammation maintenance in dermatomyositis. *Acta Neuropathol.* **2017**, *134*, 655–666. [[CrossRef](#)]
63. Uruha, A.; Allenbach, Y.; Charuel, J.L.; Musset, L.; Aussy, A.; Boyer, O.; Mariampillai, K.; Landon-Cardinal, O.; Rasmussen, C.; Bolko, L.; et al. Diagnostic potential of sarcoplasmic MxA expression in subsets of dermatomyositis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2019**, *45*, 513–522. [[CrossRef](#)]
64. Inoue, M.; Tanboon, J.; Okubo, M.; Theerawat, K.; Saito, Y.; Ogasawara, M.; Indrawati, L.A.; Uruha, A.; Okiyama, N.; Fujimoto, M.; et al. Absence of sarcoplasmic myxovirus resistance protein A (MxA) expression in antisynthetase syndrome in a cohort of 194 cases. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2019**, *45*, 523–524. [[CrossRef](#)]
65. Bronner, I.M.; Hoogendijk, J.E.; Veldman, H.; Ramkema, M.; van den Bergh Weerman, M.A.; Rozemuller, A.J.; de Visser, M. Tubuloreticular structures in different types of myositis: Implications for pathogenesis. *Ultrastruct. Pathol.* **2008**, *32*, 123–126. [[CrossRef](#)]
66. Carpenter, S.; Karpati, G.; Rothman, S.; Watters, G. The childhood type of dermatomyositis. *Neurology* **1976**, *26*, 952–962. [[CrossRef](#)]
67. Wong, D.; Kea, B.; Pesich, R.; Higgs, B.W.; Zhu, W.; Brown, P.; Yao, Y.; Fiorentino, D. Interferon and biologic signatures in dermatomyositis skin: Specificity and heterogeneity across diseases. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e29161. [[CrossRef](#)]
68. Arndt, V.; Dick, N.; Tawo, R.; Dreiseidler, M.; Wenzel, D.; Hesse, M.; Fürst, D.O.; Saftig, P.; Saint, R.; Fleischmann, B.K.; et al. Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr. Biol.* **2010**, *20*, 143–148. [[CrossRef](#)]

69. Milisenda, J.C.; Pinal-Fernandez, I.; Lloyd, T.E.; Grau, J.M.; Miller, F.W.; Selva-O'Callaghan, A.; Christopher-Stine, L.; Stenzel, W.; Mammen, A.L.; Corse, A.M. Accumulation of autophagosome cargo protein p62 is common in idiopathic inflammatory myopathies. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2021**, *39*, 351–356.
70. Fischer, N.; Preusse, C.; Radke, J.; Pehl, D.; Allenbach, Y.; Schneider, U.; Feist, E.; von Casteleyn, V.; Hahn, K.; Ruck, T.; et al. Sequestosome-1 (p62) expression reveals chaperone-assisted selective autophagy in immune-mediated necrotizing myopathies. *Brain Pathol.* **2020**, *30*, 261–271. [[CrossRef](#)]

13 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/ Datum:

Unterschrift:

14 Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Betreuerin **Prof. Dr. med. Anne Schänzer**, die mir nicht nur ein interessantes Promotionsthema anvertraut hat, sondern mich aktiv an ihrer Leidenschaft an der Erforschung von Muskelerkrankungen teilhaben ließ. Dank ihrer engagierten Betreuung wurde mir die Teilnahme an verschiedenen Kongressen und Symposien ermöglicht und ich wurde immer ermutigt, eigene Beiträge zu präsentieren. Bei jeglichen Fragen und Unsicherheiten konnte ich mich immer auf ihr schnelles Feedback und eine konstruktive Kritik verlassen.

Mein besonderer Dank gilt den **Patient*innen** der Neuropädiatrie des UKGM, die ihre Muskelbiopsien für diese Dissertation zur Verfügung gestellt haben. Ohne deren Einverständnis bzw. das Einverständnis der Erziehungsberechtigten wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

Natürlich gilt mein nächster Dank dem gesamten Team des Instituts für Neuropathologie in Gießen, insbesondere **Hannah Schlierbach** und **Kerstin Leib**, die im Labor meine ersten Ansprechpartnerinnen waren, auf meine vielen Fragen immer passende Antworten parat hatten und mir mit viel Geduld alle Färbungen und Präparationen erklärten. Namentlich zu erwähnen sind hier auch **Sabrina Frank, Angela Roth, Gudrun Schmidt, Helga Will, Diana Cullu und Nadine-Isabelle Adolph**. Nicht zuletzt möchte ich **Prof. Dr. med. Till Acker** für die Bereitstellung des Labors und des gesamten Inventars danken. Bei dieser Gelegenheit möchte ich mich auch bei den anderen Doktorand*innen bedanken, die mir durch den steten Austausch von Erfahrungen und wertvollen Tipps eine große Hilfe waren, hier zu nennen sind **Dr. med. Jonas Görlach, Lisann Gulatz** und **Elisabeth Schumann**.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn **Helge Hudel** vom Institut für medizinische Informatik in Gießen, der leider im Frühjahr 2022 unerwartet verstorben ist. Seine empathische und motivierte Art hat nicht nur die statistische Auswertung dieser Arbeit beeinflusst, sondern hatte mehrere Semester die Lehre von Biomedizinischer Statistik an der JLU maßgeblich geprägt.

Abschließend möchte ich mich bei **meinen Freund*innen und meiner Familie** bedanken, die mich schon während des gesamten Studiums und auch bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt, begleitet und motiviert haben. Auf die warmen Worte, guten Ratschläge und auch spitzen Kommentare **meiner Eltern, meiner Schwester und meines Partners** konnte ich mich jederzeit verlassen und ich hätte sie auch niemals missen wollen.

Vielen Dank.