

## **Jahresbericht 2016**

### **Forschungsprojekte im Heimer Institut, Institut für Muskelforschung am Neurologischen Univ.-Klinikum Bergmannsheil Bochum**

Am Heimer Institut wurden im Jahr 2016 wissenschaftliche Projekte zu erblichen und erworbenen Muskelerkrankungen durchgeführt. Die Fragestellungen hierbei waren auf die Erforschung der Krankheitsentstehung von Muskelerkrankungen sowie die Entwicklung neuer Therapieansätze gerichtet.

Zum Spektrum der untersuchten Muskelerkrankungen gehörten die Protein-Aggregations-Myopathien (PAM), insbesondere die myofibrillären Myopathien (MFM), die sporadische Einschlusskörpermyositis (sIBM), die sog. Rippling-Myopathie und eine erbliche Myopathie mit einem Defekt von BICD2. Hinsichtlich der Therapie von Myopathien fokussierten wir uns in 2016 zum einen auf die Initiierung grundlagenorientierter Kooperationen mit der Univ. Witten-Herdecke und dem Institut für Anatomie der Ruhr-Universität Bochum (RUB), sowie auf klinische Therapiestudien der Pompe-Erkrankung.

Das Heimer Institut verfolgt das Prinzip, wissenschaftliche Kooperationen mit etablierten vorklinischen Instituten im Ruhrgebietsraum, vornehmlich der RUB, in vernetzter Weise durchzuführen. Sollten darüber bestimmte Fragestellungen oder methodische Herausforderungen bestehen, wird auf existierende Kontakte mit anderen Instituten in Deutschland oder im Ausland zurückgegriffen.

Auf Einzelheiten der aktuellen Projekte wird im Folgenden näher eingegangen.

#### **I. Proteinaggregat-Myopathien**

##### **Proteomanalysen bei myofibrillären Myopathien (Kley, Vorgerd, Kooperationen mit Bonn / Erlangen)**

Myofibrilläre Myopathien (MFM) sind erbliche Muskelerkrankungen, die durch eine fokale Desintegration von Myofibrillen sowie durch massive Proteinaggregationen in Muskelfasern charakterisiert sind. Sie führen zu progredienten Paresen mit meist schweren körperlichen Beeinträchtigungen. Die Lebenserwartung kann insbesondere bei einer Beteiligung der Atemmuskulatur sowie bei einer begleitenden Kardiomyopathie deutlich reduziert sein. Die bisher bekannten MFM-Gene kodieren Proteine, die an der Z-Scheibe lokalisiert oder mit dieser assoziiert sind. Bei etwa 50% der MFM-Patienten ist der ursächliche Gendefekt allerdings noch unbekannt. Die Therapie der MFM ist bislang rein symptomatisch.

In Kooperation mit dem Medizinischen Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum (MPC, Leiterin Prof. Dr. Katrin Marcus) haben wir eine hochsensitive Methode etabliert, um die Zusammensetzung der Proteinaggregate bei MFM aufzuschlüsseln. Hierbei werden Aggregate und Kontrollgewebe aus Muskelschnitten von MFM-Patienten mittels Laser-Mikrodissektion ausgeschnitten und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Hierdurch können Hunderte Proteine in den Proben identifiziert

werden. Ein Label-freies Verfahren zur relativen Quantifizierung ermöglicht darüber hinaus die Detektion von Proteinen, die sich signifikant in den Aggregaten anreichern. Diese Untersuchungen liefern wertvolle neue Informationen über krankheitsrelevante Proteine und Signalwege, die unser Verständnis der Pathogenese der MFM erweitern. Zudem konnten wir bereits für verschiedene MFM-Formen spezifische proteomische Profile und Biomarker identifizieren, die bei der differentialdiagnostischen Abklärung von Protein-Aggregations-Myopathien hilfreich sind.

Zur Erweiterung der vorgenannten proteomischen Analysen arbeiten wir derzeit an der Etablierung von neuen Verfahren zur absoluten Proteinquantifizierung in Muskelproben sowie zur Quantifizierung von Kernproteinen.

### **Kombination von Proteomanalysen und Next Generation Sequencing zur Identifikation neuer PAM-Gene (Kley, Humangenetik der RUB)**

Wie bereits erwähnt ist der kausative Gendefekt bei etwa der Hälfte der MFM-Patienten noch unbekannt. Dies gilt auch für andere Formen der PAM. Die Kombination von Proteomanalysen mit modernen molekulargenetischen Analyseverfahren ist ein vielversprechender Ansatz, um neue PAM-Gene zu identifizieren.

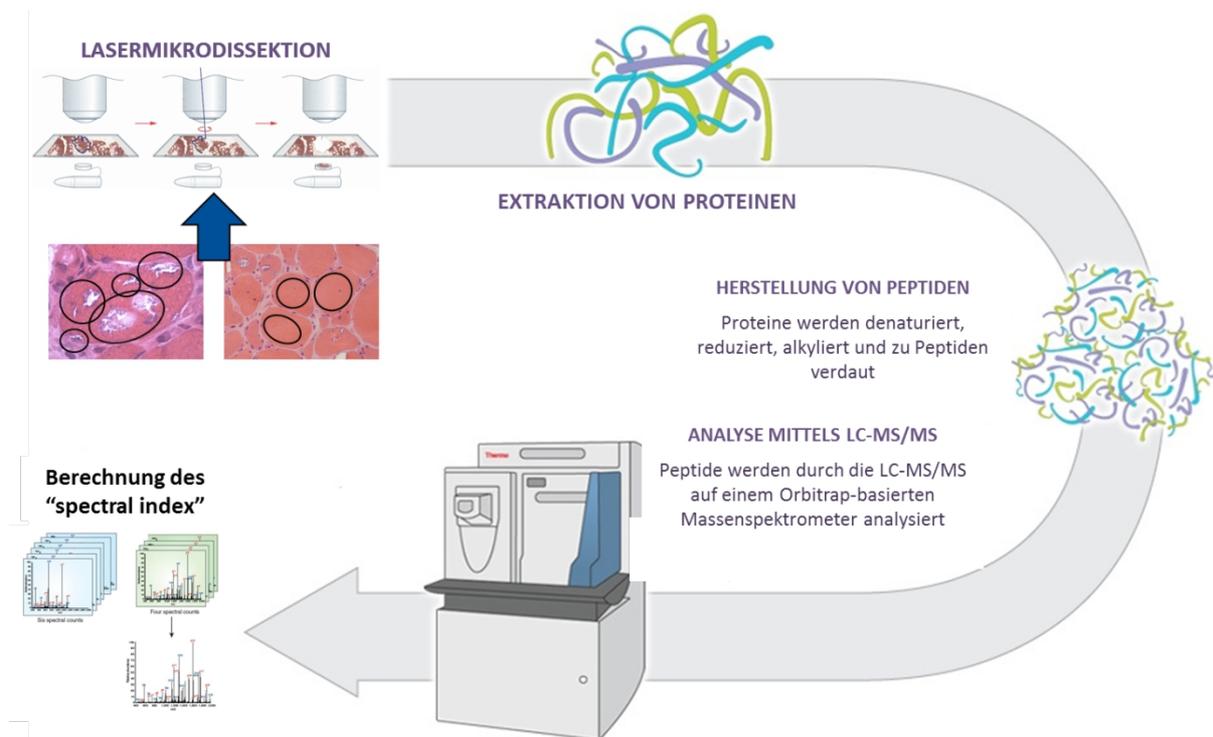
Bei diesem Projekt konzentrieren wir uns auf Patienten, bei denen eine PAM histologisch gesichert und Mutationen in bekannten PAM-Genen ausgeschlossen wurden. Zunächst wird das gesamte Exom, d.h. alle Genabschnitte, die potentiell Proteine kodieren, sequenziert (Whole Exome Sequencing, WES). Diese Analysen allein sind in der Regel jedoch wenig aussagekräftig, vor allem wenn nur einzelne Patienten untersucht werden. Das liegt daran, dass durch WES in der Regel Tausende von unklaren genomischen Varianten (UGV) detektiert werden, von denen die meisten keinen Krankheitswert besitzen. Entscheidend ist daher die Filterung der Daten. Hierfür greifen wir auf die Ergebnisse der bei diesen Patienten durchgeführten Proteomanalysen zurück. Hintergrund ist, dass bei den bekannten PAM-Formen meist auch das mutierte Protein in den Proteinablagerungen akkumuliert. Wir fokussieren uns daher bei unserer Panel-Diagnostik auf diejenigen Gene, die die in den Aggregaten angereicherten Proteine kodieren. Die Anzahl der Kandidaten-Gene reduziert sich dadurch von mehr als 20.000 auf etwa 100 bis 200. Vor der Durchführung weitergehender funktioneller Studien wird die Relevanz der in diesen Genen nachgewiesenen UGV durch einen Abgleich mit internationalen Datenbanken und durch *in silico*-Analysen abgeschätzt.

### **Charakterisierung von Zell- und Maus-Modellen der MFM (Kley, Kooperationen mit Bonn / Erlangen)**

In einem DFG-geförderten Netzwerk wissenschaftlicher Arbeitsgruppen wurden verschiedene Zell- und Mausmodelle von MFM-Unterformen (Desmin, Filamin C) etabliert. Zur Charakterisierung dieser Modelle, zur Identifizierung pathogenetisch relevanter Proteine und zur Untersuchung von Signalwegen führen wir Live-Cell-Imaging-Studien, Immunfluoreszenz-Analysen, funktionelle Studien und Proteomanalysen durch.

## II. Proteomanalysen bei der Einschlusskörpermyositis (sIBM) (Kley, Güttsches, Vorgerd)

Analog zu unseren Studien bei den MFM konnten wir in 2016 ein Forschungsprojekt bei der sIBM in Kooperation mit dem Centre for Neuromuscular Diseases am Queens Square London und der Washington University St. Louis, USA sehr erfolgreich abschliessen. Hierbei wurden an sIBM-Proben quantitative Proteomanalysen und genetische Analysen durchgeführt. Unsere Untersuchungen konnten erstmals zeigen, dass das Autophagie-Protein FYCO-1 an der Pathogenese der sIBM wesentlich beteiligt ist und einen neuartigen Risikofaktor dieser Erkrankung darstellt. Nach unseren umfangreichen Analysen sind für die Krankheitsentstehung primär degenerative Faktoren verantwortlich, die wahrscheinlich zu sekundär entzündlichen Veränderungen führen. Daraus können wichtige therapeutische Schlussfolgerungen abgeleitet werden, die in Richtung therapeutische Modulation der Autophagie und Regulation der Proteinqualitätskontrolle gehen. Die Ergebnisse unserer Arbeit wurden kürzlich in der international renommierten Zeitschrift *Annals of Neurology* zur Publikation angenommen.



## III. Immunogene Rippling-Myopathie (Güttsches, Vorgerd)

Wir etablieren derzeit in Kooperation mit der Klinik für Plastische Chirurgie am Univ.-Klinikum Bergmannsheil ein Mausmodell der immunogen bedingte Rippling-Erkrankung. Diese Erkrankung zeichnet sich durch einen besonderen klinischen Phänotyp aus, der mutmasslich durch einen AK-vermittelten Immunprozess gerichtet gegen Moleküle des Caveolin-3-Proteinkomplexes an der Zellmembran hervorgerufen wird. Ziel dieser Analysen ist es, am Mausmodell die molekularen Auswirkungen dieser Erkrankung auf die Skelettmuskulatur detaillierter zu untersuchen und Aussagen zu möglichen Therapieoptionen zu treffen.

#### **IV. Beschreibung einer neuen Myopathie mit einem BICD2-Defekt (Vorgerd, Güttches, Kley; Physiologie der RUB Unger und Link; Humangenetik Köln Wirth)**

In 2016 konnten wir erfolgreich eine langjährige Kooperation zur Untersuchung der molekularen Mechanismen einer neuartigen Muskelerkrankung abschließen und in der Zeitschrift *Neurology* publizieren.

Hierbei wurden 2 Familien aus Deutschland untersucht, in denen diese Erkrankung aufgrund eines autosomal-dominanten Erbgangs gehäuft vorkam. Mittels MRT- und histologischer Untersuchungen konnten wir zunächst feststellen, dass es sich hierbei um eine Muskelerkrankung mit klinischen Auswirkungen auf die distale Beinmuskulatur und molekularen Auswirkungen auf den Proteinsynthese-Apparat der Muskelzelle handelt. Durch umfangreiche genetische Studien gelang der erstmalige Nachweis, dass in diesen beiden Familien die Erkrankung durch Mutationen im BICD2-Gen verursacht werden. BICD2 ist ein entscheidendes Molekül, welche neu synthetisierte Proteine vom Golgi-Apparat gezielt an bestimmte Zieladressen der Muskelzelle weiterleitet. In Kooperation mit der Humangenetik Köln haben wir die ersten Auswirkungen dieser BICD2-Mutationen in Zellkultur-Muskelzellen untersucht und festgestellt, dass das Protein BICD2 aggregiert und diese Aggregate in den Zellkern der Muskelzellen verlagert werden.

Diese Ergebnisse sind für konsekutive Projekte wesentlich. Zum einen haben wir erstmals gezeigt, dass BICD2 eine wichtige Funktion im Skelettmuskel hat, die in zukünftigen Analysen detaillierter verstanden werden müssen. Zum anderen können Patienten mit ähnlichen klinischen Merkmalen gezielt auf Mutationen in diesem neuen Myopathie-Gen getestet werden, wodurch sich die klinische Betreuung und Diagnostik dieser Patienten verbessern wird.

#### **V. Therapieforschung**

##### **Grundlagen zur Stammzellforschung erblicher Myopathien (Vorgerd, Anatomie der RUB Zähres, Brandt-Saberi)**

Im Berichtszeitraum 2016 wurde die Initiierung der therapeutischen Stammzellforschung im Verbund von Heimer Institut und dem Institut für Anatomie an der RUB weiter geführt. Im Rahmen dieser Kooperation sollen zunächst Krankheitsmodelle erblicher Myopathien am Beispiel der Gliedergürtelmuskeldystrophie LGMD 2A (basierend auf einem Calpain-3-Defekt) entwickelt werden, die auf induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) bestehen. Damit möchten wir die Mechanismen besser verstehen, die zum Krankheitsbild dieser Erkrankung beitragen. Davon erhoffen wir uns in Zukunft neuartige Therapieoptionen zur Behandlung. Denkbar sind die gezielte Kultivierung und Expansion von iPSC aus Patienten-Zellen (z.B. Hautzellen), Überführung dieser iPSC in Muskelzellen mit gleichzeitiger Korrektur des Gendefekt mit der CRISPR/CAS- Technologie.

##### **Therapiestudien an MFM-Zellmodellen (Kley, Kooperation mit Dr. E. Schulz, Univ. Witten-Herdecke)**

Wir testen innovative Therapieansätze zur Behandlung von MFM, z.B. die Induktion von Chaperonen durch Pharmaka, zunächst an Zellkultur-Modellen. Die Evaluation der Effekte dieser Therapien auf die Aggregatbildung, auf relevante Signalwege und auf die Vitalität der Zellen erfolgt u.a. mittels

quantitativer Live-Cell-Imaging-Analysen, Immunfluoreszenz- und Western Blot-Studien sowie durch vergleichende Proteomanalysen. Diese Studien dienen als Vorarbeiten für künftige Untersuchungen an Tiermodellen.

### **Studienzentrum für die Enzyersatztherapie bei der erblichen Stoffwechsel-Erkrankung M. Pompe (Vorgerd, Güttsches, Kley)**

Bei der Pompe-Erkrankung handelt es sich um eine erbliche Erkrankung im lysosomalen Stoffwechsel der Skelettmuskulatur, die seit 2006 ursächlich mit einer sog. Enzyersatztherapie (ERT) behandelt werden kann. Wir sind Studienzentrum für die weitere Erforschung der „ERT der nächsten Generation“ und nehmen an internationalen Therapiestudien dieser Erkrankung teil.

#### **VI. Personalia**

Am 4. Dezember 2016 ist nach schwerer Erkrankung unsere langjährige Mitarbeiterin Frau Alexandra Maerkens, M.Sc., Doktorandin der Neurologischen Univ.-Klinik Bergmannsheil, im Alter von 38 Jahren verstorben. Wir haben ihr wesentliche Impulse der proteomischen Forschung am humanen Skelettmuskel zu verdanken und sie war stets eine wichtige Brücke zwischen dem Heimer-Institut und dem Medizinischen ProteomCenter an der RUB. In dankbarer Anerkennung ihrer außergewöhnlichen Leistungen haben wir ihr die kürzlich zur Publikation angenommene Arbeit „Proteomics of rimmed vacuoles define new risk allele in inclusion body myositis“ in der renommierten Zeitschrift Ann Neurology gewidmet.

#### **VII. Publikationen in 2016**

[Proteomics of rimmed vacuoles define new risk allele in inclusion body myositis.](#) Güttsches AK, Brady S, Krause K, **Maerkens A**, Uszkoreit J, Eisenacher M, **Schreiner A**, Galozzi S, **Mertens-Rill J**, **Tegenthoff M**, Holton JL, Harms MB, Lloyd TE, **Vorgerd M**, Wehl CC, Marcus K, **Kley RA**. Ann Neurol. **2016** Dec 23 [Epub ahead of print]

[Expanding the phenotype of BICD2 mutations toward skeletal muscle involvement.](#) Unger A, Dekomien G, **Güttsches A**, **Dreps T**, **Kley R**, **Tegenthoff M**, Ferbert A, Weis J, Heyer C, Linke WA, Martinez-Carrera L, Storbeck M, Wirth B, Hoffjan S, **Vorgerd M**. Neurology. **2016** Nov 22;87(21):2235-2243.

[Confocal Cornea Microscopy Detects Involvement of Corneal Nerve Fibers in a Patient with Light-Chain Amyloid Neuropathy Caused by Multiple Myeloma: A Case Report.](#) Sturm D, Schmidt-Wilcke T, Greiner T, Maier C, Schargus M, **Tegenthoff M**, **Vorgerd M**. Case Rep Neurol. **2016** Jun 27;8(2):134-9.

[Unveiling of miRNA Expression Patterns in Purkinje Cells During Development.](#) Pieczora L, Stracke L, **Vorgerd M**, Hahn S, Theiss C, Theis V. Cerebellum. **2016** Jul 7. [Epub ahead of print]

[New insights into the protein aggregation pathology in myotilinopathy by combined proteomic and immunolocalization analyses.](#) **Maerkens A**, Olivé M, **Schreiner A**, Feldkirchner S, Schessl J, Uszkoreit J, Barkovits K, **Güttsches AK**, Theis V, Eisenacher M, **Tegenthoff M**, Goldfarb LG, Schröder R, Schoser

B, van der Ven PF, Fürst DO, **Vorgerd M**, Marcus K, **Kley RA**. Acta Neuropathol Commun. **2016** Feb 3;4:8

[Widening the spectrum of filamin-C myopathy: Predominantly proximal myopathy due to the p.A193T mutation in the actin-binding domain of FLNC.](#) van den Bogaart FJ, Claeys KG, **Kley RA**, Kusters B, Schrading S, Kamsteeg EJ, Voermans NC. Neuromuscul Disord. 2017 Jan;27(1):73-77.

[Mutant desmin substantially perturbs mitochondrial morphology, function and maintenance in skeletal muscle tissue.](#) Winter L, Wittig I, Peeva V, Eggers B, Heidler J, Chevessier F, **Kley RA**, Barkovits K, Strecker V, Berwanger C, Herrmann H, Marcus K, Kornblum C, Kunz WS, Schröder R, Clemen CS. Acta Neuropathol. **2016** Sep;132(3):453-73.

[New aspects of myofibrillar myopathies.](#) **Kley RA**, Olivé M, Schröder R. Curr Opin Neurol. **2016** Oct;29(5):628-34.

[215th ENMC International Workshop VCP-related multi-system proteinopathy \(IBMPFD\) 13-15 November 2015, Heemskerk, The Netherlands.](#) Evangelista T, Wehl CC, Kimonis V, Lochmüller H; VCP related diseases Consortium. Neuromuscul Disord. **2016** Aug;26(8):535-47.

#### VIII. **Unterstützung durch die Heimer-Stiftung**

Die Geräteausstattung durch die Heimer-Stiftung hat wesentlich zu den wissenschaftlichen Erfolgen im Berichtszeitraum beigetragen. Mit dem High end Lasermikroskop liessen sich erstmalig kleinste Strukturveränderungen innerhalb von Muskelfasern der Einschlusskörpermyositis *in toto* isolieren und anschließend proteinchemisch untersuchen. Dies war eine wichtige methodische Voraussetzung dafür, wissenschaftlichen Aussagen zur Entstehung dieser Erkrankung treffen zu können. Mit dem aus Mitteln der Heimer-Stiftung angeworbenen Live-Cell Mikroskop liessen sich ein Teil der Untersuchungen zum BICD2-Defekt und im sIBM-Projekt realisieren.

#### IX. **Team**

Prof. Dr. med. Matthias Vorgerd, Leiter des Heimer Instituts

Jun.-Prof. Dr. med. Rudolf A. Kley, Leiter der Arbeitsgruppe Experimentelle Myologie, Stellv. Leiter des Heimer Instituts

Dr. med. Anne Güttsches, Fachärztin für Neurologie

Hajo Eilau, Doktorand

Thomas Dreps, Medizin-Doktorand (BICD2-Projekt)

Ingo Wahner, Master-Student

Anja Schreiner, Dagmar Tintrup-Lamm, Janine Mertens-Rill, Medizinisch-Technische Assistentinnen