

Jahresbericht 2018

Heimer Institut für Muskelforschung

Neurologische Klinik, Berufsgenossenschaftliches Universitätsklinikum Bergmannsheil

Ruhr-Universität Bochum

Einleitung

Ziele und Arbeitsweise des Heimer Instituts

Das im Jahr 2014 gegründete Heimer Institut für Muskelforschung (<http://heimer-institut.de>) widmet sich der Erforschung erblicher und erworbener Muskelerkrankungen. Die Schwerpunkte der wissenschaftlichen Arbeiten sind die klinische und morphologische Phänotypisierung von Patienten mit Muskelerkrankungen sowie die Erforschung der molekularen Krankheitsentstehung ausgewählter Myopathien. Basierend auf den neu gewonnenen Erkenntnissen sollen Konzepte für die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung dieser Muskelerkrankungen entwickelt werden.

Die wissenschaftlichen Arbeiten am Heimer Institut werden sowohl eigenständig als auch in vielfältigen wissenschaftlichen Kooperationen innerhalb des Berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinikums Bergmannsheil, mit weiteren Instituten der Ruhr-Universität Bochum als auch deutschlandweit und international durchgeführt (<http://heimer-institut.de/kooperationen.php>).

Projekte der Klinischen Forschung und der Grundlagenforschung

Die im Jahr 2018 durchgeführten Wissenschaftsprojekte im Heimer-Institut bezogen sich sowohl auf Muskelerkrankungen, die durch einen monogenetischen Defekt (Gliederergürtel-Muskeldystrophien, Myofibrilläre Myopathien) bedingt sind, wie auch auf erworbene Myopathien, die durch nicht-erbliche, u.a. immunogene Faktoren (Einschlusskörpermyositis) hervorgerufen werden. Auf diese Projekte wird im folgenden näher eingegangen und die wesentlichen Ergebnisse im Berichtszeitraum 2018 zusammengefasst.

Autosomal-rezessiv erbliche Muskeldystrophien

Bei den Gliederergürtelmuskeldystrophien (LGMD) handelt es sich um eine klinisch und genetisch sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen. Mit einer Prävalenz von ca. 30:100.000 zählen sie zu den seltenen Erkrankungen. Die LGMD werden - je nach zu Grunde liegendem Gendefekt - in verschiedene Unterformen eingeteilt. Die häufigste Unterform stellt die LGMD2A, oder Calpainopathie, dar. Klinisch ist die Calpainopathie durch eine fortschreitende, proximale Tetraparese gekennzeichnet. Zudem sind Achillessehnenkontrakturen häufig, die meist schon früh im Krankheitsverlauf auftreten. Die Symptome treten erstmals im jungen Erwachsenenalter auf, entwickeln sich langsam progredient bis zum Verlust der Gehfähigkeit und einer meist hochgradigen Einschränkung der Selbstständigkeit. Der CK-Wert ist häufig stark erhöht. Histopathologisch zeigt sich das Bild einer chronisch-aktiven Myopathie mit Lipofibromatose, Kaliberschwankungen der Muskelfasern, Zellnekrosen und -regeneraten. Zudem zeigt sich eine fehlende oder deutlich

reduzierte Expressionsminderung von Calpain 3 im Western Blot. Die Diagnosesicherung erfolgt über eine molekulargenetische Diagnostik der Betroffenen. Die bisherigen therapeutischen Interventionen bei Muskeldystrophien (auch bei der LGMD2A) sind symptomorientiert angelegt und zielen darauf ab, den Krankheitsverlauf zu verzögern und die Lebensqualität der betroffenen Patienten zu verbessern. Neueste gentherapeutische Ansätze in Zell- und Tiermodellen haben gezeigt, dass es bei Muskeldystrophien prinzipiell möglich ist, die Effekte der ursächlichen genetischen Mutationen auszugleichen, indem den betroffenen Muskelzellen fehlerfreie Genkopien bereitgestellt werden. Diese Ansätze verfolgen eine kausal-bezogene Strategie, um an der genetischen Ursache der Erkrankung und deren Korrektur anzusetzen.

Stammzellarbeiten bei einer erblichen Muskeldystrophie (LGMD2A)

Mit der Abteilung für Anatomie und Molekulare Embryologie der RUB (PD Dr. H. Zähres, Prof. Dr. B. Brandt-Saberi) besteht seit 2016 eine Kooperation zur Entwicklung eines Krankheitsmodells, in dem aus Hautzellen von Patienten (sog. Fibroblasten) induzierbare pluripotente Stammzelllinien generiert, diese in eine Muskelzell-Linie differenziert und in einem sog. 3D-Organoid-System auf pathophysiologisch relevante Veränderungen untersucht werden. An diesem Organoid lassen sich gut die Mechanismen analysieren, die auf molekularer Ebene wesentlich zum Krankheitsbild der Calpainopathie beitragen. Daran können auch Ansätze überprüft werden, bei denen durch Korrekturen des Gendefekts z.B. mit der CRISPR/Cas9-Methode eine Verbesserung der Muskelzellfunktion erreichen werden soll. Im Jahr 2018 wurden die ersten Ergebnisse in einer bereits zur Begutachtung eingereichten Publikation zusammengefasst. Dieses Kooperationsprojekt von Institut für Anatomie und Heimer Institut wurde vom FoRUM-Beirat im November 2018 mit einem Förderpreis der Kosing-Stiftung für einen Graduiertenkolleg zur stammzell-basierten Therapie von erblichen Muskelerkrankungen ausgezeichnet.

Gentherapeutische Behandlungsansätze von Muskeldystrophien mit adenoviralen Vektoren

Basierend auf diesen grundlagenwissenschaftlich angelegten Ergebnissen der Generierung eines Muskelzell-Organoids verfolgen wir in einem Nachfolgeprojekt das langfristige Ziel, durch Gentransfer einen kausal-orientierten Therapieansatz der Muskeldystrophien zu entwickeln. Dazu haben wir in 2018 eine Gemeinschaftsarbeit mit dem Institut für Virologie und Mikrobiologie der Univ. Witten-Herdecke (Dr. E. Ehrke-Schulz, Univ.-Prof. Anja Ehrhardt) begonnen, um mit viralen Vektoren (aus Adenoviren und adeno-assoziierte Viren) gentherapeutische Ansätze für erbliche Myopathien zu entwickeln.

Es werden hierbei zunächst sog. High Capacity adenovirale Vektoren (HCA_{AdV}) und AAV9-Vektoren hergestellt, die fehlerfreie Calpain 3-spezifische Genkopien in humane und aus der Maus stammende Myoblasten transduzieren sollen. Damit wird zunächst der virale Gentransfer im präklinischen Zell-System der LGMD2A geprüft, bevor dieser Ansatz dann evtl. auch im Tiersystem (Mausmodell) und im 3D-Organoid-System der LGMD2A eingesetzt werden soll. Übergeordnetes Ziel dieses Projektes ist es, einen sicheren und effizienten gentherapeutischen Einsatz mit viralen Vektoren bei Muskeldystrophie-Patienten zu entwickeln.

Erbliche Myopathien mit monogenetischen Defekten im Bereich des kontraktiven Myofibrillensystems (Myofibrilläre Myopathien, MFM)

Myofibrilläre Myopathien (MFM) sind erbliche oder sporadisch auftretende Muskelerkrankungen, die durch eine fokale Degeneration des myofibrillären Apparates und durch massive Proteinansammlungen in den Muskelfasern charakterisiert sind. Sie führen zu fortschreitenden Muskelschwächen und deutlichen Einschränkungen der körperlichen Leistungsfähigkeit. Die Lebenserwartung kann insbesondere bei einer Beteiligung der Atemmuskulatur sowie bei einer begleitenden Kardiomyopathie deutlich reduziert sein. Die Therapie der Myofibrillären Myopathien ist bislang nur rein symptomatisch möglich.

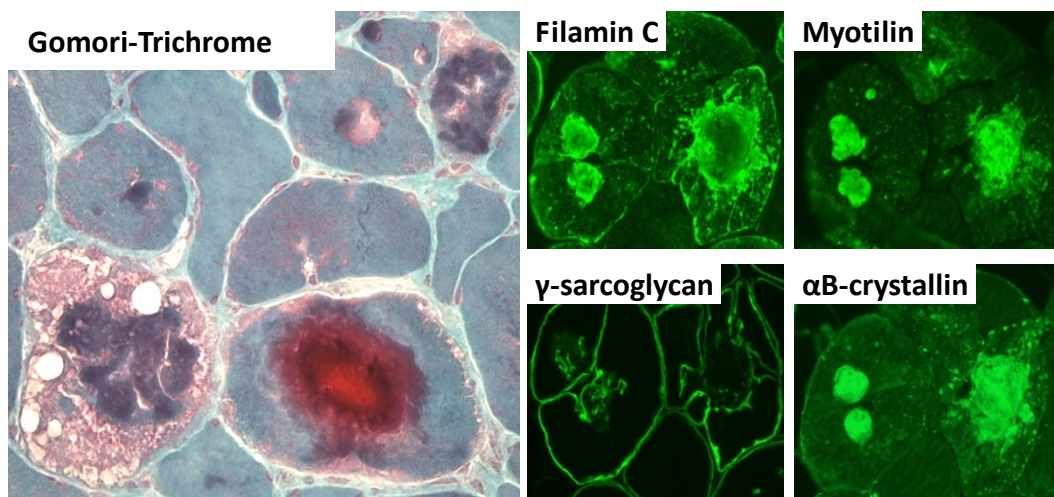


Abbildung: Typische histologische Veränderungen bei einer MFM. Deutliche intrazelluläre Proteinaggregate in einigen Muskelfasern (links, Trichrom-Gomori-Färbung), immunhistologische Untersuchungen zur Zusammensetzung der Proteinaggregate, die u.a. aus Filamin C, Myotilin, verschiedenen Sarkoglykanen bestehen (Auswertung einer MFM-Muskelbiopsie durch das Muskellabor der Neurologischen Univ.-Klinik Bergmannsheil).

Ein typischer Vertreter dieser Krankheitsgruppe Myofibrillärer Myopathien ist die Filaminopathie. Mutationen des humanen Filamin-C (FLNC)-Gens auf Chromosom 7q32 führen zu einer langsam progredienten Myopathie, können jedoch auch eine isolierte Kardiomyopathie hervorrufen. In einem aktuellen Projekt führen wir eine Transduktion von Myoblasten (C2C12-Zellen, immortalisierte humane Myoblasten) mit viralen Vektoren (High Capacity adenovirale Vektoren, HCAV) durch, die verschiedene pathogene FLNC-Mutationen für den Gentransfer tragen. An diesen genetisch veränderten Muskelzellen soll die Pathogenese der Filaminopathie näher untersucht werden. Hierbei werden wir gezielt analysieren, wie sich die Proteinaggregate bei FLNC-Mutationen im zeitlichen Verlauf entwickeln und in welcher zeitlichen Dynamik die Architektur des myofibrillären kontraktiven Apparates verändert wird. Nachfolgend sollen durch Transfektion von CRISP/CAS9-gRNA-Elementen von Muskelzell-Linien ein auf den jeweiligen Mutationstyp abgestimmte Reparatur dieser zellulären Veränderungen geprüft werden.

Enzyersatztherapie bei der erblichen Stoffwechselmyopathie M. Pompe

Die humane Pompe-Erkrankung wird durch Mutationen des Saure Alpha-Glucosidase-Gens auf Chromosom 17q25 verursacht. Es handelt sich um eine durch mangelnde Enzymaktivität der Sauren Maltase hervorgerufene lysosomale Glykogenspeicherkrankheit, die vor allem zu einer progredienten Myopathie und Kardiomyopathie führt. Seit 2006 gibt es die Möglichkeit, den Krankheitsprozess mit Hilfe einer lebenslang anzuwendenden Enzyersatztherapie positiv zu beeinflussen. Wir nehmen als Studienzentrum an internationalen Therapiestudien (AMICUS-Studie ATB200-02, COMET-Studie) teil, um die Wirksamkeit einer weiter entwickelten Enzyersatztherapie zu überprüfen.

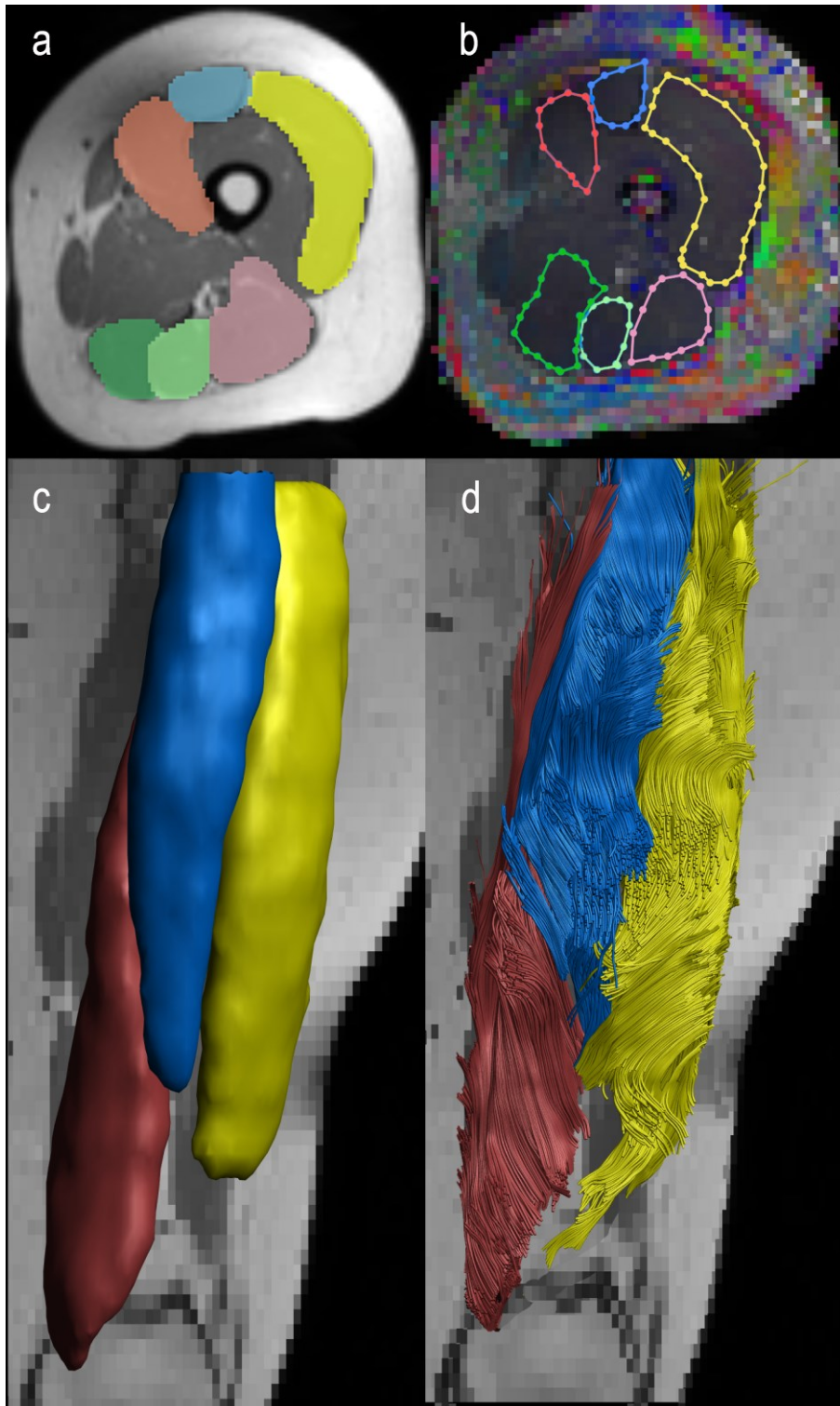


Abbildung: mDTI-Bildgebung am Skelettmuskel: DTI basiert auf dem Prinzip der eingeschränkten Diffusion von Wassermolekülen im Muskel-Gewebe, typische MR-Traktografie-Darstellung von Oberschenkel-Muskeln - a) und b) jeweils quer, c) und d) jeweils längs - bei einer gesunden Person.

Parallel zu diesen Therapiestudien wurde von der Neuroimaging-Arbeitsgruppe der Neurologischen Klinik (Dr. Lara Schlaffke, Univ.-Prof. Dr. M. Tegenthoff) bei M. Pompe-Patienten ein neuartiges Magnetresonanz-Tomografie-Verfahren (sog. DTI-Bildgebung, Diffusion-Tensor-Imaging) etabliert. Hierbei wurden überwiegend erwachsene M. Pompe-Patienten auf Früh-Veränderungen der Bein-Muskulatur in einem Hochleistungs-MR-Tomografie-Gerät (3 Tesla- Magnetfeld-Stärke) hin untersucht und diese mit den derzeitig routinemäßig eingesetzten MRT-Verfahren verglichen. Die ersten Ergebnisse zeigen, dass mit diesem DTI-Verfahren bereits frühzeitig Veränderungen der Skelettmuskulatur nachgewiesen werden können, bevor es zu einem fettigen Umbau der betroffenen Muskulatur kommt. Diese Ergebnisse machen dieses Verfahren nicht nur für M. Pompe-Patienten, sondern potentiell auch für andere Patienten-Gruppen erblicher wie auch erworbener Myopathien interessant. Weitere Arbeiten sind darauf angelegt, das DTI-Verfahren auch in zukünftigen klinischen Studien zur Gentherapie als objektives Verfahren zur Überprüfung der Therapie-Effizienz einzusetzen. Aktuell führen wir daher eine klinische Studie mit Patienten durch, die zur Muskelbiopsie aufgenommen wurden. Mit Hilfe dieser Studie soll das DTI- Verfahren validiert und für die Diagnostik der Myopathien weiter optimiert werden. Dr. L. Schlaffke, Neurologische Univ.-Klinik Bergmannsheil, wurde für die Entwicklung dieses DTI-Verfahrens in 2018 mit dem Heinemann-Preis der RUB ausgezeichnet.

Erworbene Myopathien

Sporadische Einschlusskörpermyositis

Die sporadische Einschlusskörpermyositis (sIBM) ist die häufigste Muskelerkrankung des höheren Erwachsenenalters. Klinisch ist diese Erkrankung durch fortschreitende Lähmungen und Atrophien der Skelettmuskulatur gekennzeichnet. In der Pathogenese dieser Erkrankung scheinen multiple Faktoren eine Rolle zu spielen. In der Muskelbiopsie sind sowohl entzündliche Veränderungen der Muskelfasern als auch „rimmed vacuoles“ nachweisbar, die durch einen veränderten autophagischen Abbau von Zellproteinen entstehen.

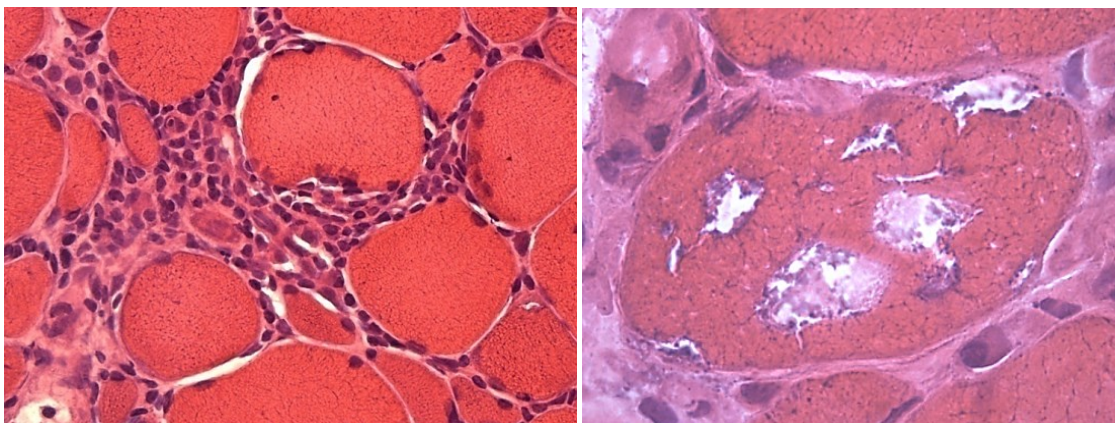


Abbildung: Typische histologische Veränderungen bei der sIBM. Entzündliche Gewebsveränderungen (links), vakuolische Strukturveränderungen (sog. *rimmed vacuoles*) (Auswertung einer sIBM-Muskelbiopsie durch das Muskellabor der Neurologischen Univ.-Klinik Bergmannsheil) .

In Zusammenarbeit mit dem Medizinischen Proteomcenter (MPC), Abteilung Funktionelle Proteomics, konnte eine kombinierte LMD/MS-Methode (Lasermikrodissektion/ Massenspektrometrie) zur Analyse dieser *rimmed vacuoles* bei sIBM Patienten etabliert werden. Zudem wurde im Rahmen einer internationalen Kooperation mit Prof. C. Wehl, Washington University of St. Louis, USA, umfangreiche genetische Untersuchung bei sIBM – Patienten durchgeführt, um seltene genetische Varianten bei sIBM zu identifizieren. Durch diesen kombinierten proteomischen und genetischen Ansatz konnte das Autophagie-assoziierte Protein FYCO1 identifiziert werden: seltene Varianten von FYCO1 traten überdurchschnittlich häufig bei Patienten mit sIBM auf. Zudem konnte proteomisch vermehrt FYCO1 in *rimmed vacuoles* nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen verifiziert.

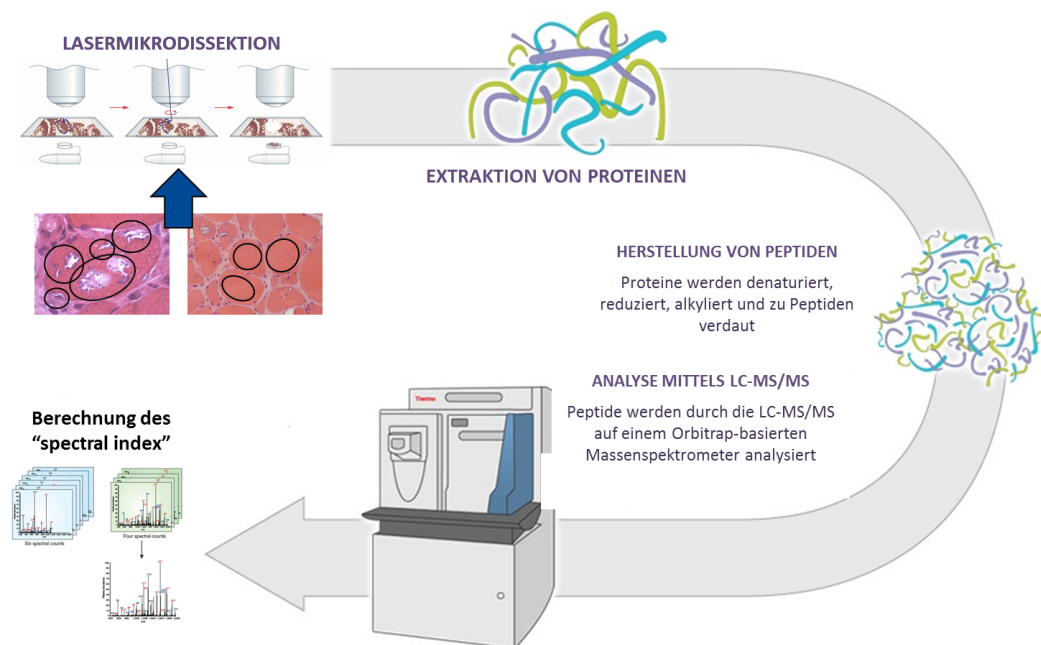


Abbildung: Schematische Darstellung der proteomischen Analyse von Rimmed Vacuoles bei der sIBM; das in diesem Projekt eingesetzte Lasermikrodissektions-Gerät wurde dankenswerterweise durch die Heimer-Stiftung finanziert.

Die seltenen genetischen FYCO1- Varianten wurden im Mausmodell weiter untersucht. Die seltenen FYCO1-Varianten, die bei sIBM überproportional häufig auftraten, führen zur Expression eines veränderten FYCO1- Proteins. Diese FYCO1- Variante ist nur unzureichend funktionell und führt dazu, dass die Verbindung zu anderen Autophagie-assoziierten Proteinen geschwächt ist. Neben FYCO1 konnten weitere, in der Pathogenese der sIBM noch nicht bekannte Proteine beschrieben werden, die ebenfalls an der Autophagie und zellulären Mechanismen der Protein-Qualitätskontrolle beteiligt sind. Die Arbeiten wurden in der Zeitschrift *Annals of Neurology* publiziert (Güttches et al. 2017) eine weitere Publikation befindet sich derzeit in der Phase der Ausarbeitung für ein peer review

Journal. Das Projekt wurde 2018 mit dem 1. Posterpreis der FoRUM-Tagung der Ruhr-Universität Bochum für Dr. Anne Güttches, Neurologie Bergmannsheil, ausgezeichnet.