

Jahresbericht 2017

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>).

Besetzung der Stiftungsprofessur für Translationale Myologie

Die am Heimer-Institut neu geschaffene Stiftungsprofessur für Translationale Myologie wurde im Mai 2017 mit Herrn Prof. Dr. med. Christoph Clemen besetzt. Die Personalkosten dieser Stelle werden für die ersten fünf Jahre durch die Heimer-Stiftung getragen.

Mit der Berufung von Herrn Prof. Clemen an das Heimer-Institut und der labortechnischen Neuausrüstung des Heimer-Instituts wird nun als neuer Schwerpunkt eine sowohl grundlagenorientierte als auch translationale Forschung für verschiedene Proteinaggregationsmyopathien ermöglicht. Eine Grundlage hierfür sind mehrere Mausmodelle, darunter die Desmin knock-out, die R349P Desmin knock-in, die W2711X Filamin-C knock-in und die R155C VCP knock-in Linien, die Herr Prof. Clemen von seinem bisherigen Standort am Institut für Biochemie I der Medizinischen Fakultät zu Köln an das Heimer-Institut in Bochum transferieren kann.

Team des Heimer-Instituts

Das Team 2017 des Heimer-Instituts wird gebildet durch Herrn Prof. Dr. med. Matthias Vorgerd (Leiter des Heimer-Instituts, Ltd. Oberarzt der Neurologischen Universitätsklinik Bergmannsheil), Herrn Prof. Dr. med. Christoph Clemen (Heimer-Forschungsprofessur für Translationale Myologie, Oberarzt der Neurologischen Universitätsklinik Bergmannsheil), Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Kley (Juniorprofessur für Klinische und Experimentelle Myologie, Stellv. Leiter des Heimer-Instituts, Leiter des Muskelzentrums Ruhrgebiet, Oberarzt der Neurologischen Universitätsklinik Bergmannsheil), Frau Dr. med. Anne Güttsches (Fachärztin für Neurologie), Frau Janine Mertens-Rill (Medizinisch-Technische Assistentin), Frau Anja Schreiner (Medizinisch-Technische Assistentin) und Frau Dagmar Tintrup-Lamm (Medizinisch-Technische Assistentin).

Wissenschaftliche Arbeiten am Heimer-Institut

Eine aktuelle Auflistung der wissenschaftlichen Publikationen der Mitarbeiter des Heimer-Instituts sowie mit Förderung durch die Heimer-Stiftung ist auf der Homepage des Heimer-Instituts zu finden (<http://heimer-institut.de/publikationen.php>).

In den folgenden Abschnitten des Jahresberichts werden die einzelnen Forschungsprojekte am Heimer-Institut – beschränkt auf die hauptsächlichen Arbeiten in 2017 – näher beschrieben:

Projekte der Klinischen Forschung und der Grundlagenforschung

Myofibrilläre Myopathien

Myofibrilläre Myopathien sind erbliche oder sporadisch auftretende Muskelerkrankungen, die durch eine fokale Degeneration des myofibrillären Apparates und durch massive Proteinaggregationen in den Muskelfasern charakterisiert sind. Sie führen zu fortschreitender Muskelschwäche 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.

Desminopathie

Die Desminopathie, die durch Mutationen des humanen Desmin-Gens auf Chromosom 2q35 hervorgerufen wird, ist eine klassische Form der Myofibrillären Myopathien. Neben einer Skelettmuskel-Myopathie erkranken diese Patienten häufig auch an einer fortschreitenden Herzerkrankung, die klinisch durch eine Herzmuskelschwäche wie auch Herzrhythmusstörungen charakterisiert ist.

In den laufenden Projekten zur Desminopathie wird das Wechselspiel zwischen normalem und mutiertem Desmin in entsprechenden Modellen für die menschliche Erkrankung, einem R349P Desmin knock-in Mausmodell und davon abgeleiteten Kulturen immortalisierter Myoblasten, untersucht, um die klinischen, morphologischen, biomechanischen, funktionellen als auch biochemischen Veränderungen während der Entwicklung der progressiven Skelett- und Herzmuskelpathologie zu charakterisieren. Die R349P Desmin knock-in Mäuse entwickeln eine altersabhängige Desmin-positive Proteinaggregationspathologie mit einer Schwäche der Skelettmuskulatur, einer dilatativen Kardiomyopathie, sowie kardialen Arrhythmien und Reizleitungsstörungen, so wie es auch in der humanen Erkrankung zu finden ist. Zuletzt wurden die gravierenden Veränderungen in der Morphologie, den Enzymaktivitäten und der DNA der Mitochondrien charakterisiert. Diese Untersuchungen sollen im Verlauf des Projekts erweitert und im Rahmen eines für 2018 geplanten Antrags auf eine DFG-Förderung fortgeführt werden.

In 2017 haben wir uns auf die ausgeprägten Veränderungen in den zellulären Systemen der Proteinqualitätskontrolle fokussiert. Hierbei haben wir erstmals auch das neu generierte Modell der immortalisierten Desminopathie-Myoblasten eingesetzt. Die Gegenwart des R349P-mutierten Desmins erhöht die Proteasomaktivität, stimuliert die Makroautophagie, fehlreguliert die Chaperon-abhängige selektive Autophagie und erhöht die Mengen und verändert die sarkomerische Lokalisation von Hitzeschockproteinen. Wir gehen davon aus, dass diese Veränderungen der

Proteinhomöostase zu dem von uns im Desminopathie-Mausmodell beobachteten Abbau des extrasarkomerischen Zytoskeletts und des myofibrillären Apparats führt.

Wir bereiten derzeit eine weitere Proteom-Studie an unseren immortalisierten Desminopathie-Myoblasten vor, die auf einer Kombination von Tandem Mass Tags und Stable Isotope Labeling in Cell Culture basiert, um im Detail Genotypen-spezifische Veränderungen des Proteinumsatzes von normalem und mutiertem Desmin und seinen Bindepartnern zu erfassen. Wir werden mit diesen Messungen auch die Umsatzraten weiterer Proteine bestimmen, so dass wir neue Einsichten in die Pathogenese der Desminopathie gewinnen werden. Zu diesem Projekt wird in 2018 ein derzeit entstehender Antrag auf DFG-Förderung eingereicht werden.

Filaminopathie

Ein zweiter klassischer Vertreter der Myofibrillären Myopathien ist die Filaminopathie. Mutationen des humanen Filamin-C-Gens auf Chromosom 7q32 führen ebenfalls zu einer Myopathie und Kardiomyopathie. Analog zum Desminopathie-Mausmodell wurde hier ein W2711X Filamin-C knock-in Mausmodell hergestellt und uns von unseren Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Diese Mäuse entwickeln eine Muskelschwäche, die mit einer unter Belastung stark zunehmenden Läsionspathologie der Sarkomerstruktur einhergeht. Für die Filaminopathie haben wir in 2017 auch immortalisierte Myoblastenkulturen hergestellt, um weiterführende Untersuchungen sowohl auf der Ebene des Muskelgewebes als auch der Muskelzellen durchführen zu können. Wir führen die für die Desminopathie-Modelle beschriebenen Untersuchungen auch an den Filaminopathie-Modellen durch. Entsprechend liegt der aktuelle Fokus des Filaminopathie-Projekts auf der Analyse der Morphologie, den Enzymaktivitäten und der Integrität der mitochondrialen DNA. Die wissenschaftlichen Untersuchungen zur Pathogenese der Desminopathie und Filaminopathie sowie zur Entwicklung von Therapiekonzepten für diese beiden Erkrankungen (siehe weiter unten) werden zukünftig einen Schwerpunkt der Arbeiten des Heimer-Instituts ausmachen.

Sporadische Einschlusskörpermyositis

Die sporadische Einschlusskörpermyositis 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. Hier wurden ebenfalls Proteom-Analysen durchgeführt, indem aus dünnen Muskelgewebeschnitten aus Biopsieproben von Patienten mit sporadischer Einschlusskörpermyositis Areale mit „rimmed vacuoles“ mittels Laser-Mikrodissektion ausgeschnitten und die dort angereicherten Proteine bestimmt wurden. Basierend auf diesen Arbeiten werden aktuell die Proteinmengen und Lokalisationsmuster eines so identifizierten heterooligomeren Chaperon-ATPase-Komplexes in humanen Proben sporadischer Einschlusskörpermyositis bestimmt.

IBMPFD-Multisystemerkrankung

Mutationen des humanen VCP/p97-Gens auf Chromosom 9p13.3, das für eine hochkonservierte Triple-A ATPase mit Funktionen in sehr vielen verschiedenen zellulären Abläufen kodiert, führen

neben anderen neurodegenerativen Erkrankungen zu einer spät auftretenden autosomal-dominanten Form einer Einschlusskörper-Myopathie assoziiert mit einem M. Paget der Knochen und einer frontotemporalen Demenz (IBMPFD, Inclusion Body Myopathy associated with Paget's disease of the bone and Frontotemporal Dementia). Die IBMPFD-Skelettmuskelpathologie zeichnet sich durch degenerative Veränderungen und filamentöse VCP- und Ubiquitin-positive zytoplasmatische und nukleäre Proteinaggregate aus. Um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die dieser VCP-Erkrankung zugrunde liegen, haben wir ein R155C VCP knock-in Mausmodell generiert und ausgiebig phänotypisch und morphologisch untersucht. Aktuell wird hier noch die Expression von sowohl normalem als auch mutiertem VCP auf mRNA- und Proteinebene bestimmt.

BICD2-Myopathie

Mutationen des humanen BICD2-Gens auf Chromosom 9q22 führen zu unterschiedlich ausgeprägten Formen der Spinalen Muskelatrophie sowie zu einer Form der Hereditären Spastischen Paraplegie. Wir konnten in einer vorherigen Arbeit zeigen, dass BICD2-Mutationen nicht nur zu einem vorwiegend neuronalen Phänotyp führen, sondern auch zu einer langsam progredienten Myopathie. BICD2 funktioniert unter anderem als Adaptorprotein im zellulären Vesikeltransport. Aktuell haben wir damit begonnen, die subzellulären Lokalisationen, Funktionen und Bindepartner von BICD2 in humanem Skelettmuskelgewebe und immortalisierten murinen Wildtyp-Muskelzellen zu untersuchen. Da es sowohl im Menschen als auch in der Maus jeweils mehr als eine Isoform von BICD2 gibt, müssen diese Varianten zunächst noch mit Hilfe neu herzustellender spezifischer Antikörper charakterisiert werden.

Projekte zur Entwicklung von Therapiestrategien

Pharmakologische Ansätze

Die im Rahmen mehrerer DFG-geförderter Forschungsprojekte hergestellten Mausmodelle und immortalisierten Myoblastenkulturen zur Desminopathie und Filaminopathie werden im Rahmen eines mehrjährigen Projekts für Medikamenten- bzw. Substanztests eingesetzt werden. Es soll damit in einzelne Prozesse eingegriffen werden, die sich in unseren bisherigen Arbeiten zur Pathophysiologie beider Erkrankungen als pathologisch verändert herausgestellt haben. In diesem Jahr wurden dazu die Generierungen der entsprechenden Kulturen immortalisierter Myoblasten erfolgreich abgeschlossen und damit begonnen, die experimentellen Bedingungen für den Einsatz der Mausmodelle zu ermitteln. Im weiteren Verlauf sollen pharmakologische Therapieversuche hinsichtlich ihrer Wirkung auf beispielsweise die Bildung der Desmin-positiven Proteinaggregate, die Korrektur der fehlregulierten zellulären Proteinqualitätskontrollsysteme, die Reduktion der ausgeprägten mitochondrialen Veränderungen und die Milderung der sarkomerischen Veränderungen evaluiert werden. Ziel ist es, pharmakologische Bedingungen mit einer zellprotektiven Wirkung und einer damit verbundenen Steigerung der Muskelkraft zu bestimmen, die die Grundlage für erste zielgerichtete Therapiestudien bei humanen Desminopathie- und Filaminopathie-Patienten sein könnten.

Gentherapeutischer Ansatz mit adeno-assoziiertem Virus Serotyp 9

Unsere Desminopathie-Mäuse waren eine wesentliche Grundlage für die ersten gentherapeutischen Studien zur Desminopathie, die im Rahmen eines DFG-geförderten Forschungskonsortiums

durchgeführt wurden. Bei diesem gentherapeutischen Ansatz wurde untersucht, inwieweit mit mittels dem adeno-assoziierten Virus Serotyp 9 das Wildtyp-Desmin-Protein in Herzmuskelzellen von Desmin knock-out Mäusen exprimiert werden kann, um die Kardiomyopathie in diesem Mausmodell abzuschwächen. Es konnte eine partielle Wiederherstellung der Desmin-Expression und der damit verbundenen Verbesserung der kardialen Funktion erreicht werden. Aktuell werden die Daten aus einer Nachfolgestudie an Desmin knock-out sowie homozygoten R349P Desmin knock-in Mäusen als zwei verschiedene Modelle für humane autosomal-rezessive Desminopathie-Kardiomyopathien ausgewertet.

Gentherapeutischer Ansatz mit adenoviralen Vektoren

In einer in 2017 begonnenen neuen Gemeinschaftsarbeit mit dem Institut für Virologie und Mikrobiologie der Universität Witten-Herdecke (Dr. E. Ehrke-Schulz) überprüfen wir, inwieweit sich einzelne Serotypen adenoviraler Vektoren dazu eignen, humane und murine Myoblasten zu infizieren, um schließlich Desmin- oder Filamin-C-Konstrukte in Wildtyp- sowie Desminopathie- und Filaminopathie-Myoblasten einzubringen.

Stammzellarbeiten

Die humane Calpainopathie, auch Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2A genannt, wird durch Mutationen im humanen Caplain-3-Gen auf Chromosom 15q15 verursacht und betrifft in unterschiedlichen Formen die Skelettmuskulatur. Als Kooperationspartner nehmen wir an der Entwicklung eines Krankheitsmodells teil, das auf der Verwendung von aus Patienten-Zellen abgeleiteten induzierten pluripotenten Stammzelllinien besteht. Damit sollen die Mechanismen besser verstanden werden, die zum Krankheitsbild der Calpainopathie beitragen, und die Möglichkeit überprüft werden, ob induzierte pluripotente Stammzelllinien nach Korrektur des Gendefekts z.B. mit der CRISPR/Cas9-Methode in Muskelzellen differenziert und zur Anwendung am Patienten eingesetzt werden können.

Enzymersatztherapie

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 Enzymersatztherapie positiv zu beeinflussen. Wir nehmen als Studienzentrum an internationalen Therapiestudien (AMICUS-Studie ATB200-02, COMET-Studie) teil, um die Wirksamkeit einer weiter entwickelten Enzymersatztherapie zu überprüfen.