

Jahresbericht 2020

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, eine Verbesserung der Diagnostik von Muskelerkrankungen hin zu nichtinvasiven bildgebenden Verfahren, sowie die Erforschung der Krankheitsentstehung ausgewählter Myopathien auf molekularer Ebene. 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 Forschung

Das Institut konzentriert sich auf drei Kernprojekte, die jeweils eine eindeutige Zielrichtung haben. Um diese herum reihen sich weitere Unterprojekte mit einer Vielzahl spannender Fragestellungen ein, die den Weg zum Projektziel zukünftig begleiten werden. Neben den Kernprojekten wurde auch das Personal des *Heimer Instituts* erweitert. Es konnten neue MitarbeiterInnen gewonnen werden, die zusammen mit etablierten Kräften aus der Neurologischen Klinik im Institut eine neue Dynamik haben entstehen lassen.

Die Translationalität der Projekte wird eine zunehmende Gewichtung erhalten. Bisher haben wir die Untersuchungen vorwiegend an geeigneten Zellkultumodellen durchgeführt. Diese Modelle, so gut sie auch immer aufgebaut sind, haben den Nachteil, dass immer nur Fragestellungen an einer spezifischen Zellart untersucht werden können. Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen, insbesondere im Zusammenhang mit einem funktionierenden Immunsystem, können damit jedoch nicht verifiziert werden. Hierfür sind valide Tiermodelle unerlässlich, um dieser natürlichen Komplexität nachzukommen. Insbesondere im Hinblick auf ein mögliches gentherapeutisches Verfahren sind Erkenntnisse zur Verteilung der eingebrachten Gene, einer möglichen Immunreaktion auf die Verabreichung, sowie den erzielten gewebsspezifischen Veränderungen von entscheidender Bedeutung. Mit dem in diesem Jahr angeschafften intelligenten Käfigsystem werden wir für die anstehenden *in vivo* Studien in die Lage versetzt, Veränderungen im Bewegungsverhalten des jeweiligen Tieres früh und sehr präzise feststellen zu können. Die im Käfig befindlichen Tiere werden

dabei, mittels subkutan implantierter Transponder, rund um die Uhr in ihren Verhaltensmustern erfasst, um so ein möglichst präzises Bewegungsprofil zu erstellen. Dies ist erforderlich, um einerseits Krankheitsverläufe und andererseits Therapieerfolge zeitnah zu erkennen. Da Tiere grundsätzlich einen anderen Bewegungsapparat und grundlegenden Bewegungsdrang haben als Menschen muss eine hohe Datendichte erzeugt werden, um Änderungen im Bewegungs-, Ausdauer- und Kraftprofil erfassen zu können.

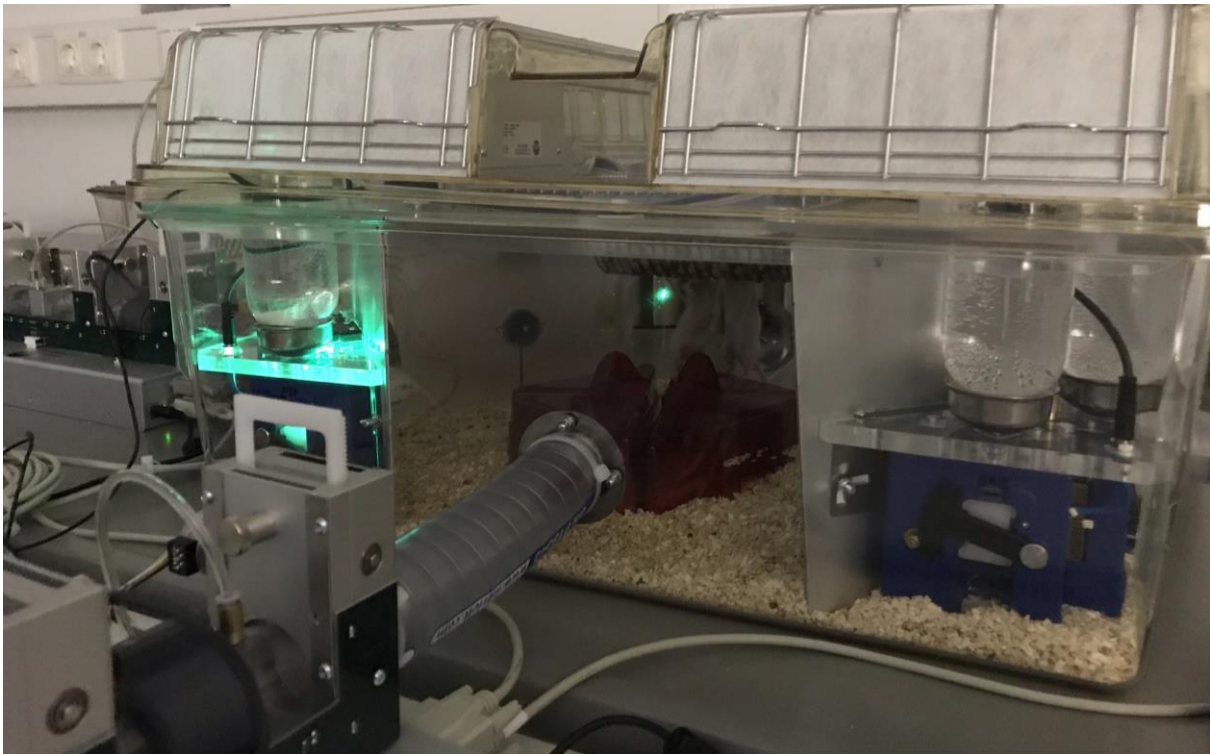


Abbildung: Das Bild zeigt das im Oktober 2020 installierte intelligente Käfigsystem für Mäuse. Über Transponder unter der Haut der Tiere können diese über Erkennungseinheiten identifiziert und in ihrem Bewegungsprofil sehr präzise vermessen werden. Grün erleuchtet ist eine von insgesamt vier Konditionierungssecken zu sehen, wo die Tiere Transponder gesteuert ihr Wasser beziehen können. Im Vordergrund ist ein von insgesamt vier elektronischen Zugängen zu den einzelnen Laufrädern zu sehen. Hier werden die Tiere gewogen, sowie Laufrichtung, Geschwindigkeit und Strecke dokumentiert.

Die im Jahr 2020 durchgeführten Wissenschaftsprojekte im *Heimer-Institut* bezogen sich sowohl auf Muskelerkrankungen, die durch einen monogenetischen Defekt (Gliedergürtel-Muskeldystrophien, Myofibrilläre Myopathien, Morbus Pompe oder McArdle-Erkrankung) 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 2020 zusammengefasst.

Autosomal-rezessiv erbliche Muskeldystrophien

Bei den Gliedergürtelmuskeldystrophien (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 (nach neuerer Klassifikation LGMDR1), 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 Selbständigkeit. Der CK-Wert ist häufig stark erhöht. Histopathologisch zeigt sich das Bild einer chronisch-aktiven Myopathie mit Lipofibromatose, Kaliberschwankungen der Muskelfasern, Zellnekrosen und –regeneration. 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 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 (LGMDR1)

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.

An diesem Model können zukünftig Ansätze überprüft werden, bei denen durch Korrekturen des Gendefekts z.B. mittels Gensatztherapie oder der Geneditierung mit CRISPR/Cas9 eine Verbesserung der Muskelzellfunktion erreicht werden sollen. Das Verfahren ist zwar technisch und personell sehr aufwendig, bietet aber umfassende Untersuchungsmöglichkeiten an Zellen mit dem genetischen und epigenetischen Hintergrund der jeweiligen Patienten. Damit lassen sich individuelle Muskelerkrankungen im Labormaßstab nachstellen und auch im Hinblick auf kausale Therapieoptionen einsetzen.

Gentherapeutische Behandlungsansätze von Muskeldystrophien mit adenoviralen Vektoren

Basierend auf diesen 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 Gemeinschaftsarbeit mit dem Institut für Virologie und Mikrobiologie der Univ. Witten-Herdecke (Dr. E. Ehrke-Schulz, Univ.-Prof. Anja Ehrhardt) begonnen, erste virale Vektoren (Adenoviren und adeno-assoziierte Viren) zu entwickeln. Diese Vektoren sollen einerseits der Entwicklung gentherapeutischer Ansätze, andererseits aber auch

einer zellbasierten Modelle tablierung dienen. Wir möchten sie gezielt nutzen, um die den Myopathien zu Grunde liegenden pathophysiologischen Zusammenhänge besser untersuchen zu können.

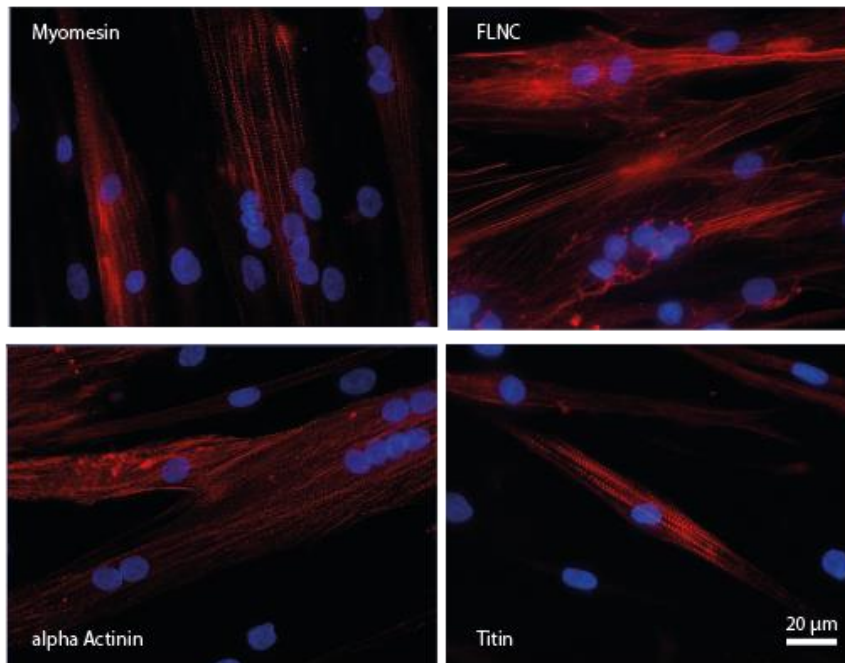


Abbildung: Hier sind differenzierende Muskelzellen gezeigt, die auf verschiedene Proteine der kontraktiven Elemente gefärbt wurden. Die Muskelzellen stammen von einem Patienten mit einer C-terminalen Verkürzung des Filamin-C (FLNC), was teilweise zu Störungen in der Strukturierung der sich differenzierenden Zellen führt. Der Maßstab liegt bei 20 µm.

Es werden hierbei zunächst sogenannte High Capacity adenovirale Vektoren (HCAdV) 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 LGMDR1 geprüft, bevor dieser Ansatz dann auch im Tiersystem (Mausmodell) und im 3D-Organoid-System der LGMDR1 eingesetzt werden soll. Übergeordnetes Ziel dieses Projektes ist es, einen sicheren und effizienten gentherapeutischen Einsatz mit viralen Vektoren bei Muskeldystrophie-Patienten zu entwickeln.

Da gentherapeutische Verfahren zur Behandlung von verschiedenen muskelspezifischen Erkrankungen zunehmend Einzug in die Klinik halten, haben wir eine Studie initiiert, welche sich mit der Prävalenz erkennender und neutralisierender Antikörper bei verschiedenen Patientengruppen gegenüber neu entwickelten und den derzeit gängigen viralen Vektorsystemen verhält. Hierfür werden Serumproben von Patienten und Probanden gewonnen und in verschiedenen Antikörpertestverfahren qualitativ und quantitativ vermessen.

Erbliche Myopathien mit monogenetischen Defekten im Bereich des kontraktiven Myofibrillen-Systems (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 MFM ist bislang nur rein symptomatisch möglich.

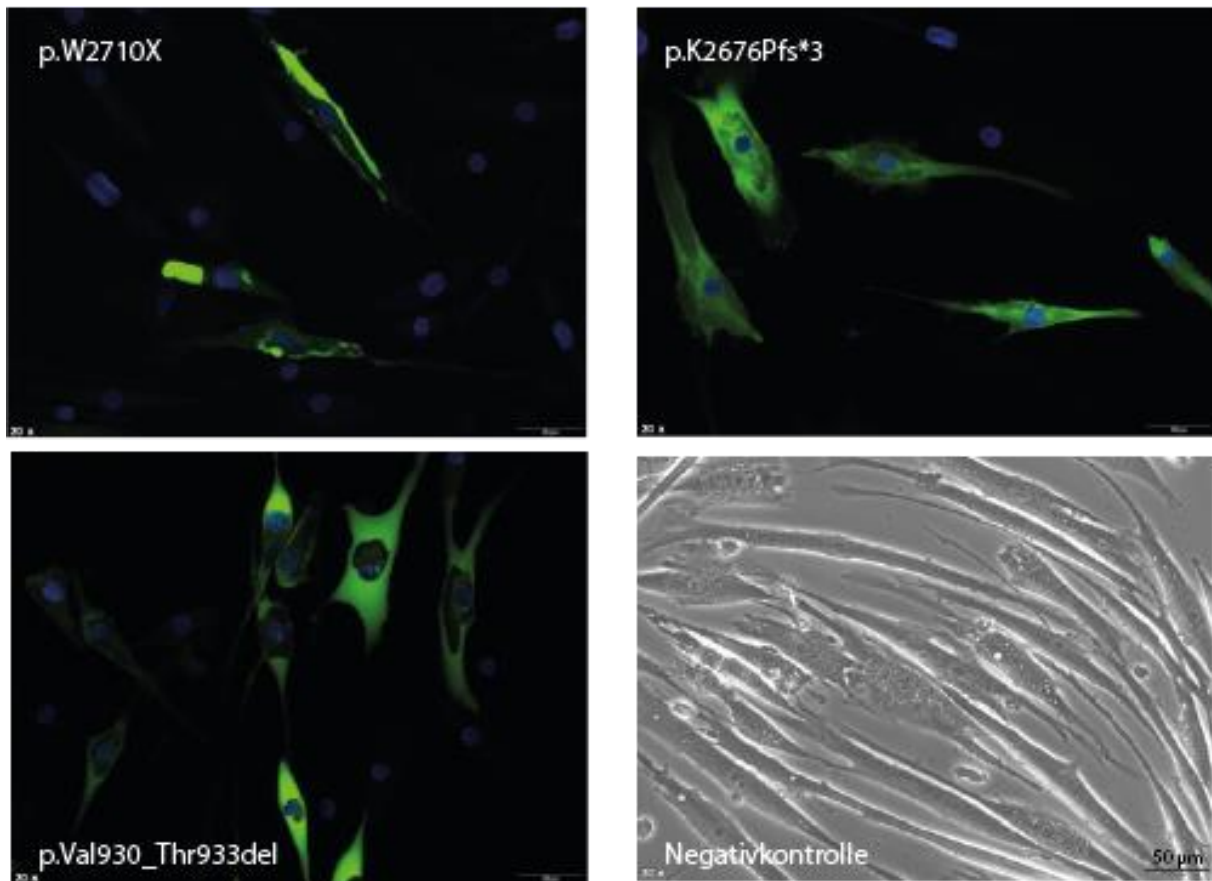


Abbildung: Die Abbildung zeigt humane Myoblasten, welche mit adenoviralen Vektoren transduziert wurden. Hierüber wurde in die Zellen ein genetisch verändertes Filamin C (grün markiert) übertragen. Die Veränderungen der beiden oberen Bilder in der Dimerisierungssequenz des Filamin C, was zu Aggregatbildungen (lokalen Konzentrationen) in der Zelle führt. Die dritte Mutation führt hingegen zu einer gleichmäßigen Verteilung innerhalb der Zelle. Der Maßstab zeigt jeweils 50 µm an.

Ein typischer Vertreter dieser Krankheitsgruppe 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, HCA₂V) 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.

Wir konnten in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen (u.a. Prof. Dr. D.O. Fürst, Univ. Bonn) einige neue Erkenntnisse zu den Auswirkungen einer weiteren *FLNC*-Varianteherausarbeiten, die als Veröffentlichung von *Neurology Genetics* akzeptiert wurde und sich derzeit im Druck befindet.

Enzyersatztherapie bei der erblichen Stoffwechselmyopathie M. Pompe

Die humane Pompe-Erkrankung wird durch Mutationen des 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

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 Beinmuskulatur in einem Hochleistungs-MR-Tomografie-Gerät (3 Tesla-Magnetfeld-Stärke) hin untersucht und diese mit den derzeitig routinemäßig eingesetzten MRT-Verfahren verglichen. Das Potential der Früherkennung wurde für dieses neue bildgebende Verfahren am Menschen bereits dargestellt und publiziert. Nun soll das Verfahren auch am Mausmodell etabliert werden, um zukünftig auch hier bessere bildgebende Untersuchungsmethoden zur Verfügung zu haben und Therapiealternativen vergleichend darstellen zu können. Hierfür wurde eine Kooperation mit der Abteilung für Neurophysiologie von Prof. Dr. Denise Manahan-Vaughan an der Ruhr-Universität Bochum begonnen, um dieses Vorhaben umsetzen zu können.

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“ (RV) nachweisbar, die durch einen veränderten autophagischen Abbau von Zellproteinen entstehen.

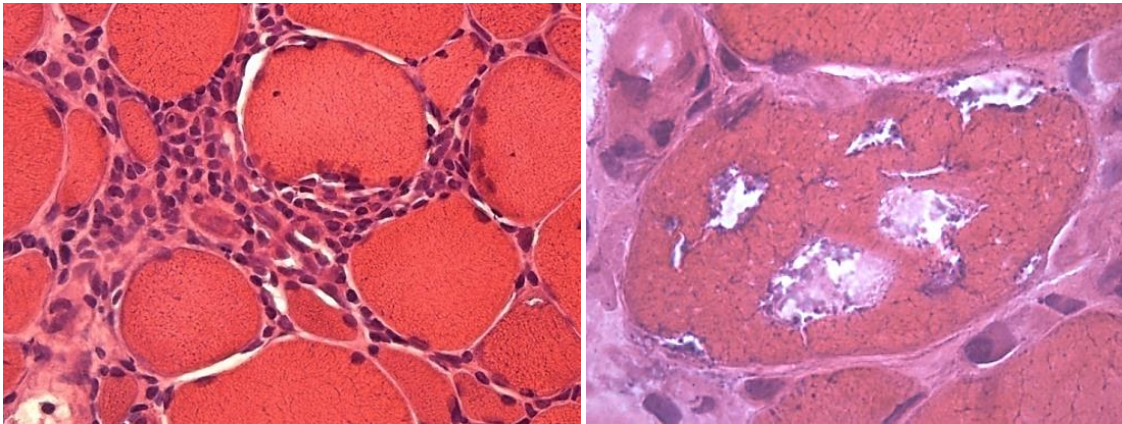


Abbildung: Typische histologische Veränderungen bei der sIBM. Entzündliche Gewebsveränderungen (links), vakuolische Strukturveränderungen (sog. *Rimmed vacuoles*) (Auswertung einer sIBM-Muskelbiopsie durch das Muskellabor der Neurologischen Univ.-Klinik Bergmannsheil).

Wir haben uns mit der Beteiligung von TCP1-alpha an der Entstehung der RV befasst. TCP1-alpha ist Bestandteil eines Chaperonkomplexes, welches an der korrekten Faltung verschiedener Proteine beteiligt ist, etwa das an der Muskelkontraktion direkt beteiligte Aktin. Ergebnisse dieser Analysen wurden in 2020 veröffentlicht.

Wissenschaftliche Publikationen mit Beteiligung des Heimer Instituts im Jahr 2020

Creation and implementation of a European registry for patients with McArdle disease and other muscle glycogenoses (EUROMAC registry). Tomàs Pinós, Antoni L. Andreu, Claudio Bruno, Georgios M. Hadjigeorgiou, Ronald G. Haller, Pascal Laforêt, Alejandro Lucía, Miguel A. Martín, Andrea Martinuzzi, Carmen Navarro, Piraye Oflazer, Jean Pouget, Ros Quinlivan, Sabrina Sacconi, Renata S. Scalco, Antonio Toscano, John Vissing, Matthias Vorgerd, Andrew Wakelin, Ramon Martí, EUROMAC Consortium. *Orphanet J Rare Dis.* 2020; 15: 187.

Multiomic elucidation of a coding 99-mer repeat-expansion skeletal muscle disease. Alessandra Ruggieri, Sergey Naumenko, Martin A. Smith, Eliana Iannibelli, Flavia Blasevich, Cinzia Bragato, Sara Gibertini, Kirston Barton, Matthias Vorgerd, Katrin Marcus, Peixiang Wang, Lorenzo Maggi, Renato Mantegazza, James J. Dowling, Rudolf A. Kley, Marina Mora, Berge A. Minassian. *Acta Neuropathol.* 2020;140(2): 231–235.

SARS-CoV-2/COVID-19 und neuromuskuläre Erkrankungen: Bestandsaufnahme der DGN (Deutsche Gesellschaft für Neurologie) Kommission Motoneuron- und neuromuskuläre Erkrankungen. B. Schoser, P. Baum, M. Boentert, K. Dillmann, A. Emmer, S. Knauss, E. Enax-Krumova, J. Grosskreutz, A. Güttsches, K. Hellwig, K. Holzapfel, C. Kornblum, H. Lehmann, A. Melms, T. Meyer, S. Petri, L. Pilgram, K. Reiners, A. Saak, J. Schäfer, J. Schmidt, C. Schneider-Gold, M. Schons, P. P. Urban, M. Vorgerd, P. Young, S. Zierz. *DGNeurologie.* 2020 May 18 : 1–10.

Muscle Diffusion tensor imaging reveals changes in non-fat infiltrated muscles in late-onset Pompe disease. Rehmann R, Froeling M, Rohm M, Forsting J, Kley RA, Schmidt-Wilcke T, Karabul N, Tegenthoff M, Vorgerd M, Schlaffke L (2020) *Muscle and Nerve* 2020;62:541–549.

Chaperones in sporadic inclusion body myositis – validation of proteomic data. Güttsches AK, Jacobsen F, Schreiner A, Mertens-Rill J, Tegenthoff M, Marcus K, Vorgerd M, Kley RA. *Muscle Nerve* 2020;61(1):116-121. *FLNC*-associated myofibrillar myopathy: new clinical, functional and proteomic data. Kley RA, Leber Y, Schrank B, Zhuge H, Orfanos Z, Onipe A, Sellung D, Güttsches AK, Eggers E, Jacobsen F, Kress W, et al. *Neurology Genetics* in press.