

# **Anoctamin-5-Myopathie – Klinik, Histologie und Proteom einer Hallenser Kohorte**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Caroline Richert

Betreuer: Prof. Dr. Stephan Zierz

Gutachter:

PD Dr. Thorsten Kraya, Halle

Prof. Dr. Matthias Vorgerd, Bochum

Datum der Verteidigung: 15.05.2023

## Referat

Die Anoctamin-5-Myopathie ist eine der häufigsten Ursachen für hereditäre Myopathie in Nordeuropa. Klinisch äußert sich diese Erkrankung durch eine proximale (LGMD) oder distale (MMD3) Muskelschwäche oder eine asymptotische Hyper-CK-ämie mit oder ohne Myalgien. Histologisch imponiert ein myopathisches Gewebesyndrom unterschiedlichen Schweregrads. Einige Patienten zeigen Amyloidablagerungen im Muskelgewebe oder auch mitochondriale Auffälligkeiten wie COX-negative Fasern oder ragged red fibres. Ursache der Erkrankung sind rezessive Mutationen im Anoctamin-5-Gen.

In dieser Arbeit wurden 12 Patienten mit genetisch nachgewiesener Anoctamin-5-Myopathie der neurologischen Universitätsklinik Halle klinisch charakterisiert und die Muskelbiopsien wurden histologisch untersucht. In 8/12 Fällen lag ein Muskel-MRT-Befund vor. Darüber hinaus erfolgte eine Proteomanalyse. Die Ergebnisse wurden mittels einer Pathwayanalyse in einer Bioinformatikdatenbank analysiert.

Klinisch zeigten 7 Patienten einen LGMD-Phänotyp, ein Patient eine distale und ein weiterer eine generalisierte Muskelschwäche. Zwei Patienten hatten eine isolierte Hyper-CK-ämie. Histologisch zeigte sich bei den Patienten ein myopathisches Gewebesyndrom unterschiedlichen Schweregrades. Darüber hinaus konnten bei den meisten der Patienten (n=10/12) Amyloidablagerungen endomysial nachgewiesen werden. Mitochondriale Veränderungen zeigten sich bei 7/12 Patienten.

Die Proteomanalyse ergab eine Hoch- bzw. Herabregulation vor allem bei Proteinen des Zytoskeletts, der Muskelkontraktion, des Energiestoffwechsels und des intrazellulären Calciumhaushalts. Bei Anoctamin-5-Muskelbiopsien mit mitochondrialen Auffälligkeiten war Transthyretin erhöht.

Zusammenfassend ergab sich in der Hallenser Kohorte keine Beziehung zwischen einem bestimmten klinischen oder histologischen Phänotyp und einem bestimmten Genotyp. Die klinische Heterogenität der Erkrankung spiegelte sich auch auf der Proteomebene wider. Anhand des Proteoms können mögliche Funktionen von Anoctamin 5 im Rahmen des intrazellulären Calciumstoffwechsels und der Membranreparatur vermutet werden.

Richert, Caroline: Anoctamin-5-Myopathie – Klinik, Histologie und Proteom einer Hallenser Kohorte, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss. 61 Seiten, 2023

## Inhalt

### Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gliedergürteldystrophien	1
1.3	Distale Myopathien	4
1.4	LGMD R12 und MMD3	5
1.5.	Anoctamin-5/TMEM16E	8
1.5.1.	Die Anoctamingruppe	8
1.5.2	Anoctamin 5	9
1.6	Amyloid	11
1.6.1	Amyloidproteine	11
1.6.2.	Vorkommen von Amyloid bei Muskelerkrankungen	12
2	Zielstellung der Arbeit	13
3	Patienten und Methoden	14
3.1	Patientenkollektiv	14
3.2.	Histologie	14
3.2.1	Probenakquise	14
3.2.2.	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	15
3.2.3	Auswertung	16
3.3.	Massenspektrometrie	16
3.3.1	Aufarbeitung der Muskelproben für die Massenspektrometrie	16
3.3.2	Proteomics Analyse der aufgearbeiteten Proben	18
3.3.3	Protein-Identifizierung und Markierungsfreie Quantifizierung	18
3.3.4	Gruppierung der Proteine und Pathway-Analyse	19
4	Ergebnisse	20
4.1	Klinische Phänotypen	20
4.2	Elektromyographie	20
4.3	Magnetresonanztomographie	21
4.4	Kardio-pulmonale Umfelddiagnostik	24

4.5	Histologie	24
4.6	Elektronenmikroskopie	26
4.7	Genetische Charakterisierung	28
4.8	Proteomics	29
4.8.1	Subgruppenanalysen	32
5	Diskussion	37
5.1	Klinische Charakteristika	37
5.2	Histologische Charakteristika	40
5.2.1	Histologische Auffälligkeiten bei Patienten mit Amyloidablagerungen	41
5.3	Die Genetik der Hallenser Anoctamin-5-Patienten	43
5.4	Das Proteom bei Anoctamin-5-Myopathie	43
5.4.1	Proteine des Zytoskeletts	44
5.4.2	Proteine des kontraktile Apparates	46
5.4.3	Stoffwechsel	47
5.4.4	Genregulation	49
5.4.5	Calciumhomöostase	49
5.4.6	Hitzeschockproteine	50
5.4.7	Transthyretin	51
5.4.8	Einordnung der Proteomdaten im Vergleich zur Transkriptomanalyse	52
6	Zusammenfassung	54
7	Literaturverzeichnis	55
8	Thesen	61
	Anlagen	V
	Lebenslauf	V
	Erklärungen	VII
	Danksagung	VIII

## Abkürzungsverzeichnis

ANO5	Anoctamin 5-Gen
β-APP	Amyloid-Precursor-Protein β
CaCC	calcium-aktivierter Chloridkanal (calcium-activated chlorid-channel)
CMD	kongenitale Muskeldystrophien (congenital muscular dystrophies)
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
EMG	Elektromygraphie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-QTOF-MS	Elektrospray-Ionisation Quadrupol Time-of-Flight Massenspektrometrie
FAP	Fibroadipogenic progenitor Zellen
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HSP	Hitzeschockprotein (heat shock protein)
IBM	Einschlusskörpermyositis (inclusion body myositis)
LGMD	Gliedergürteldystrophie (limb girdle muscular dystrophy)
M/Mm	Musculus/Musculi
MBB	Musculus biceps brachii
MG	Musculus gastrocnemius
MTA	Musculus tibialis anterior
MVL	Musculus vastus lateralis
MMD	Miyoshi distal myopathy
MRT	Magnetresonanztomographie
MV	Minutenvolumen (in l/min)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
OS	Oberschenkel
P-MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid-Puffer
P <sub>0,1</sub>	Mundverschlussdruck (in kPa)
PID	Patienten-ID
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species)
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und Endoplasmatischen Retikulums (Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase)
STIR	Inversion-Recovery-Sequenz
US	Unterschenkel

# 1 Einleitung

## 1.1 Gliedergürteldystrophien

Mit dem Begriff der Gliedergürteldystrophien wird ein Phänotyp bezeichnet, der sich klinisch mit Paresen im Schulter- und Beckengürtel manifestiert.

Die Gliedergürteldystrophien gehören zu den hereditären Myopathien. Erstmals wurde der Begriff der Gliedergürteldystrophie (engl. limb girdle muscular dystrophy; LGMD) 1954 von Frederick John Natrass und John Nicolas Walton geprägt. Sie definierten hierfür folgende grundsätzliche Eigenschaften:

- 1) Später Erkrankungsbeginn (meist ab der 3.-4. Lebensdekade)
- 2) Beginn mit einer muskulären Schwäche entweder im Schulter- oder Beckengürtel
- 3) Autosomaler Erbgang (beide Geschlechter betroffen)
- 4) langsam fortschreitend

(Walton und Natrass 1954).

Die Diagnose erfolgte zunächst anhand der klinischen Kriterien und durch Ausschluss anderer Erkrankungsursachen. Darüber hinaus ist eine Gliedergürtelschwäche nicht immer das Leitsymptom der Erkrankung (Angelini 2020) sondern zeigt vielmehr eine weitläufige klinische und genetische Heterogenität (Guglieri et al. 2008). Überwiegend ist der Erkrankungsverlauf symmetrisch (Murphy und Straub 2015).

Im Jahr 1991 konnten Beckmann et al. als ersten Genlocus eine Mutation im Calpain-Gen auf Chromosom 15 ausfindig machen (Beckmann et al. 1991). Seither nahm die Entdeckung weitere Genloci stetig zu.

Aufgrund der im weiteren Verlauf möglichen genetischen Charakterisierung wurde 1995 eine Klassifikation der LGMD-Subtypen anhand molekularer und genetischer Kriterien unternommen. Die autosomal-dominant vererbten Loci wurden der Klasse LGMD Typ 1 (LGMD1), die autosomal-rezessiv vererbten der Klasse LGMD Typ 2 (LGMD2) zugeordnet. Innerhalb der Klassen wurden in der Reihenfolge der Entdeckung der Genloci Buchstaben in alphabetischer Reihenfolge angehängt (Bushby et al. 1995a und 1995b).

Durch die weiterhin fortschreitende Entdeckung immer neuer Genloci wurde 2017 auf dem 2. ENMC (European Neuromuscular Center) – Workshop eine neue Klassifikation der LGMD eingeführt. Die autosomal-dominant vererbten LGMDs wurden in die Gruppe D, die autosomal-rezessiven LGMDs in die Gruppe R eingeteilt. Innerhalb dieser Gruppe wurden die Unterformen in der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert (aktuell: LGMD D1-5 und LGMD R1-27, Li et al. 2022). Die Klassifikation berücksichtigt proximale

und disto-proximale Formen mit dem Nachweis von Faserdegeneration und Fasersplitting in der histologischen Betrachtung, eine Erhöhung der Creatinkinase (CK) sowie den Nachweis von degenerativen Veränderungen und fibro-fettiger Infiltration im Muskel-MRT (Straub et al. 2018).

Aufgrund der hohen genetischen Variabilität gibt es keinen einheitlichen Pathomechanismus. Betroffene Proteine können zum Sarkolemm, dem Zytosol als auch zum Nucleolus gehören. Mögliche Schädigung der Myozyten kann sowohl durch Membraninstabilität, Fehler in der Anordnung oder Funktion des Dystroglykankomplexes oder einem Defekt der Muskelreparaturmechanismen vorkommen. Durch eine Störung des intrazellulären Calciumhaushalts kann es zu einer vermehrten Apoptose oder auch Nekrose der Fasern kommen. Die Reparaturmechanismen können auch, wenn nicht gestört, durch die erhöhte Schädigung an Fasern überfordert sein, wodurch es zu einem Ersatz von Muskelgewebe durch Binde- oder Fettgewebe kommt (Murphy und Straub 2015). Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die bisher bekannten Gliedergürteldystrophien.

Tab. 1: Übersicht zu den Gliedergürteldystrophien (LGMD) (nach Straub et al. 2018 und Li et al. 2022); D = dominant vererbt; R = rezessiv vererbt

Nomenklatur	Gen
LGMD D1 DNAJB6-related	DNAJB6
LGMD D2 TNP03-related	TNP03
LGMD D3 HNRNPDL-related	HNRNPDL
LGMD D4 calpain3-related	CAPN
LGMD D5 collagen 6-related	COL6A1, COL6A2, COL6A3
LGMD R1 calpain3-related	CAPN
LGMD R2 dysferlin-related	DYSF
LGMD R3 $\alpha$ -sarcoglycan-related	SGCA
LGMD R4 $\beta$ -sarcoglycan-related	SGCB
LGMD R5 $\gamma$ -sarcoglycan-related	SGCG
LGMD R6 $\delta$ -sarcoglycan-related	SGCD
LGMD R7 telethonin-related	TCAP
LGMD R8 TRIM 32-related	TRIM32
LGMD R9 FKRP-related	FKRP
LGMD R10 titin-related	TTN
LGMD R11 POMT1-related	POMT1
<b>LGMD R12 anoctamin5-related</b>	<b>ANO5</b>
LGMD R13 Fukutin-related	FKTN
LGMD R14 POMT2-related	POMT2
LGMD R15 POMGnT1-related	POMGnT1
LGMD R16 $\alpha$ -dystroglycan-related	DAG1
LGMD R17 plectin-related	PLEC
LGMD R18 TRAPPC11-related	TRAPPC11
LGMD R19 GMPPB-related	GMPPB
LGMD R20 ISPD-related	ISPD
LGMD R21 POGLUT1-related	POGLUT1
LGMD R22 collagen 6-related	COL6A1, COL6A2, COL6A3
LGMD R23 laminin $\alpha$ 2-related	LAMA2
LGMD R24 POMGNT2-related	POMGNT2
LGMD R25	BVES
LGMD R26	POPDC3
LGMD R27	JAG2

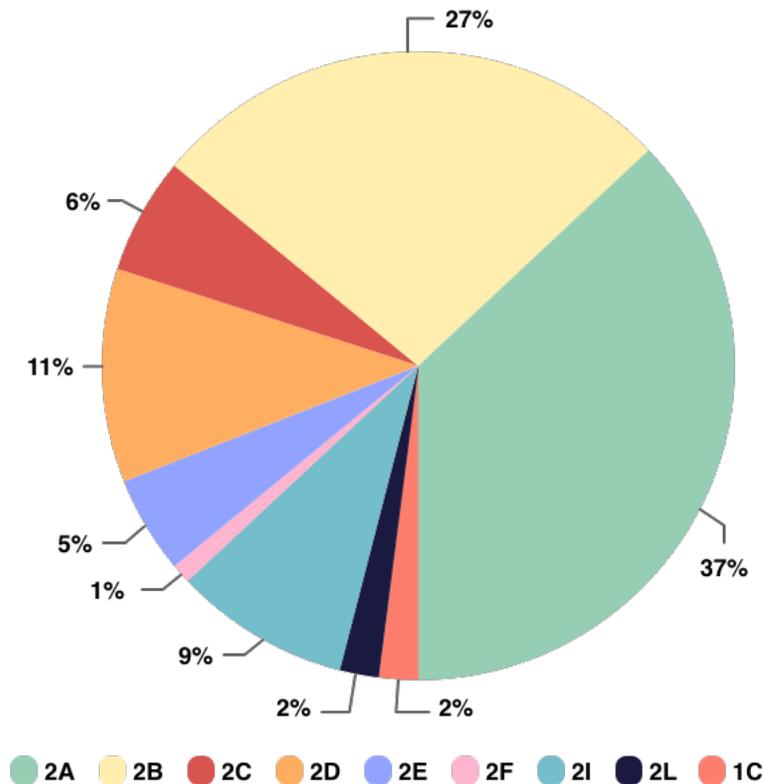


Abb. 1: Prävalenzen der verschiedenen Gliedergürtelmuskeldystrophien in einer großen italienischen Kohorte, repräsentativ für die Verteilung in Europa; 2A: Calpainopathie; 2B: Dysferlinopathie; 2C: Gamma-Sarkoglykanopathie; 2D: Alpha-Sarkoglykanopathie; 2E: Beta-Sarkoglykanopathie; 2F: Delta-Sarkoglykanopathie; 2I: Myopathie bei Mutation im FKRP (Fukutin-related Protein); 2L: Anoctaminopathie; 1C: Caveolinopathie (verändert nach Magri et al. 2012)

### 1.3 Distale Myopathien

Die distalen Myopathien sind eine heterogene Erkrankungsgruppe, der gemeinsam ist, dass sie klinisch mit einer Muskelschwäche in den Händen und oder Füßen beginnen (Felice et al. 2020). Abzugrenzen von den distalen Myopathien, die eine nachweisliche genetische Ursache haben (siehe hierzu Tabelle 2), sind Erkrankungen, bei denen die distale Muskelschwäche als Begleitphänomen auftritt, beispielsweise Polyneuropathien (Udd et al. 2014).

Tab. 2: Übersicht zu den distalen Myopathien (nach Felice et al. 2020)  
AR: autosomal-rezessiv; AD: autosomal-dominant

Nomenklatur	Gen	Heredität
	ADSSL1	AR
<b>Miyoshi Type 3</b>	<b>ANO5</b>	<b>AR</b>
Tateyama	CAV3	AD
	DNAJB6	AD
Centronuclear type 1	DNM2	AD
Miyoshi	DYSF	AR
	FLNC	AD
Nonaka	GNE	AR
	KLHL9	AD
Markesbery-Griggss	LDB3	AD
VCPDM	MATR3	AD
Laing	MYH7	AD
Myofibrillar type 3	MYTOT	AD
Nemaline type 2	NEB	AR
	SQSTM1	AD
Welander	TIA1	AD
Udd	TTN	AD
	VCP	AD

Es gibt somit Mutationen, die allelisch eine LGMD oder eine distale Myopathie auslösen können (z.B. Anoctamin 5). Die Ursache hierfür bislang unklar (Bolduc et al. 2010, Mahjneh et al. 2010).

#### 1.4 LGMD R12 und MMD3

Als LGMD R12 (ehemals LGMD 2L) und Miyoshi distal myopathy type 3 (MMD3) werden Muskelerkrankungen bezeichnet, die durch Mutationen im Anoctamin-5-Gen ausgelöst werden. Die erstmalige Beschreibung einer Muskeldystrophie ausgelöst durch eine rezessive Mutation im ANO5-Gen erfolgte durch Bolduc et al. 2010. Heute zählt die Anoctaminopathie zu den häufigen Ursachen einer Gliedergürtelmuskeldystrophie in Nordeuropa, vor allem in Finnland (Deschauer et al. 2011, Penttilä et al. 2012).

Klinisch zeigt sich ein sehr variables Bild mit drei verschiedenen Phänotypen. Zum einen gibt es die Patientengruppe mit einer Gliedergürteldystrophie (LGMD R12), die eine Schwäche des oberen und unteren Gliedergürtels sowie eine asymmetrischen Atrophie des M. quadriceps femoris und dem M. biceps brachii aufweisen. Bei einigen Patienten zeigte sich klinisch zusätzlich eine Hypertrophie der Wadenmuskulatur, welche sich im

Verlauf zu einer milden Wadenatrophie entwickelt. Eine Schwäche der distalen Muskulatur der oberen Extremität wurde nicht beschrieben (Bolduc et al. 2010).

Eine weitere Gruppe bildet die MMD3 mit dem Phänotyp einer distalen Myopathie. Charakteristisch ist hier eine Schwäche der Wadenmuskulatur. Eine Wadenatrophie wird nicht beschrieben, jedoch teilweise eine Hypertrophie der Waden. Als erste Symptome beschreiben die Patienten ein unangenehmes Gefühl in der Wadenmuskulatur, welches durch Kälte nachlasse (Mahjneh et al. 2010). Im Verlauf kann sich eine Muskelsteifigkeit entwickeln. In späteren Erkrankungsstadien konnten zudem auch eine asymmetrische Schwäche des oberen und unteren Gliedergürtels beobachtet werden (Bolduc et al. 2010, Mahjneh et al. 2010). Einige Patienten berichteten von einer exzessiven physischen Aktivität vor Erkrankungsbeginn (Hicks et al. 2011).

Der letzte Phänotyp entspricht der Gruppe der Hyper-CK-ämie mit und ohne Myalgien. Teilweise wird dieser Typ auch als „pseudometabolisch“ bezeichnet, da er klinisch den metabolischen Myopathien ähnelt (Milone et al. 2012, Liewluck et al. 2013, Silva et al. 2019, Papadopoulos et al. 2017). Von diesem Phänotyp scheinen überwiegend Frauen betroffen zu sein (Penttilä et al. 2012). Eine Erhöhung der CK ließ sich auch in den anderen beiden Gruppen nachweisen und war retrospektiv ein oftmals beobachtetes Frühsymptom (Liewluck et al. 2013).

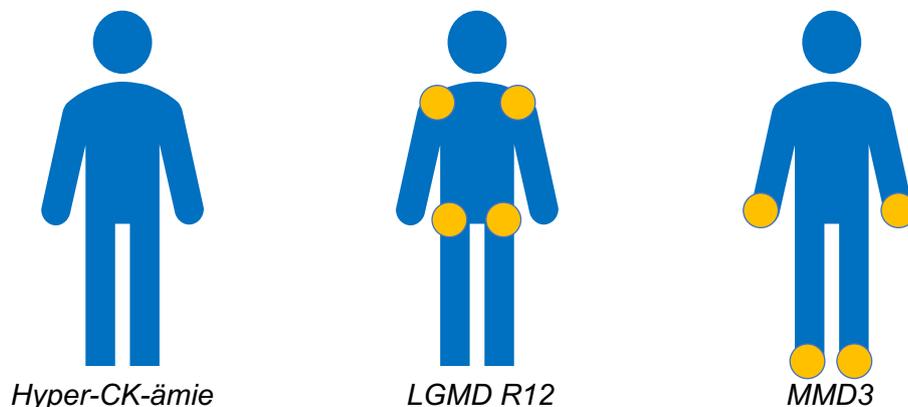


Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Phänotypen von Anoctamin-5 Myopathien

Der Erkrankungsbeginn der Anoctamin-5-Myopathie liegt im Mittel in der 3.-4. Lebensdekade (Bolduc et al. 2010). Männer scheinen im Vergleich zu Frauen häufiger und schwerer betroffen zu sein (Bolduc et al. 2010, Sarkozy et al. 2013, Hicks et al. 2011, Penttilä et al. 2012). Frauen zeigen häufiger nur eine Wadenhypertrophie ohne Schwäche sowie eine Belastungsintoleranz und eine asymptotische Erhöhung der CK (Penttilä et al. 2012). Zudem wird auch ein Overlap zwischen dem Gliedergürteltyp und der distalen Myopathie beschrieben (Hick et al. 2011). Vereinzelt tritt auch eine

kardiale Beteiligung in Form von Herzrhythmusstörungen oder einer dilatative Kardiomyopathie auf (Wahbi et al. 2013, Liewluck et al. 2013).

Histologisch zeigt sich ein myopathisches Gewebesyndrom unterschiedlichen Ausmaßes. Hierzu zählen ein erweitertes Faserkaliberspektrum, binnenständige Zellkerne, Fasersplitting und Degeneration des Muskelgewebes mit Zunahme des interfaszikulären Bindegewebes (Mahjneh et al. 2010) aber auch eine Verminderung der oxidativen Enzymaktivität und einer Vermehrung von COX-negativen Fasern (Deschauer et al. 2011). Des Weiteren konnten sowohl Regeneratfasern als auch Rimmed vacuols nachgewiesen werden (Hicks et al. 2011). Vereinzelt treten Fasernekrosen auf (Penttilä et al. 2012, Schneider et al 2014). Amyloidablagerungen in den intramuskulären Gefäßwänden konnten ebenfalls bei einigen Patienten nachgewiesen werden (Milone et al. 2012), weshalb eine Verwechslung mit einer Amyloidmyopathie auftreten kann (Liewluck und Milone 2017). Die genaue Zusammensetzung des Amyloids ist bislang unklar. Es konnten in einer Studie von Liewluck und Kollegen Apolipoprotein A1, Apolipoprotein A4, Apolipoprotein E, Gelsolin und Serumamyloid P als assoziierte Proteine identifiziert werden (Liewluck et al. 2013). Elektronenmikroskopisch waren multifokale Unterbrechungen der sarkolemmalen Membran zu beobachten (Bolduc et al. 2010). Bei asymptomatischen Patienten zeigte die Muskelbiopsie oftmals keine pathologischen Veränderungen (Liewluck et al. 2013).

Im Muskel-MRT findet sich in der Oberschenkelmuskulatur oftmals eine asymmetrische fettige Degeneration im posterioren Kompartiment. Am stärksten ausgeprägt waren die Veränderungen im Bereich der Mm. adductor magnus, semitendinosus et semimembranosus. Der M. quadriceps femoris zeigte ein eher fleckiges Muster. Bis auf wenige Ausnahmen von Patienten mit einem generalisierten Befall der Oberschenkelmuskulatur waren die Mm. rectus femoris, gracilis et sartorius erst im späteren Verlauf und am wenigsten betroffen (Hick et al. 2011, Sarkozy et al. 2012). Die Glutealmuskulatur ist meist nur mild bis moderat befallen (Sarkozy et al. 2012). Am Unterschenkel waren bei den Patienten eine moderate Atrophie des medialen M. gastrocnemius und des M. soleus nachweisbar. Das anteriore Kompartiment des Unterschenkels war wenig bis gar nicht betroffen (Hick et al. 2011). Auch hier lässt sich zwischen dem klinischen Bild und der Ausprägung der degenerativen Veränderungen im MRT keine Korrelation nachweisen (Sarkozy et al. 2012).

Das EMG zeigte myopathische Veränderungen wie Fibrillationen. Es wurden auch myotone Entladungen beobachtet (Liewluck et al. 2013).

Mittlerweile sind mehr als 200 Mutationen im *ANO5*-Gen als Auslöser für LGMD R12 und MMD3 bekannt (Vázquez et al. 2020). Die meisten treten in Exon 5, 15, 19 und 20 auf (Penttilä et al. 2012). Die häufigste Mutation weltweit ist c.191dupA in Exon 5 (Hicks et al. 2011) gefolgt von c.2272C>T in Exon 20 (Penttilä et al. 2012). Die Mutation c.191dupA ist zunächst vor allem in Nordeuropa nachgewiesen worden, was sich vermutlich auf einen Gründereffekt zurückführen lässt (Hick et al. 2011). Die Mutation c.2272C>T wurde vor allem in finnischen Familien gefunden (Penttilä et al. 2012). Eine Assoziation zwischen den einzelnen Mutationen und den Phänotypen konnte bisher nicht beobachtet werden (Mahjneh et al. 2010, Penttilä et al. 2012).

## **1.5. Anoctamin-5/TMEM16E**

### **1.5.1. Die Anoctamingruppe**

Anoctamine, auch TMEM16-Proteine (engl.: TransMEMbrane protein 16) sind eine Gruppe von Membranproteinen unterschiedlicher Funktion. Der Name Anoctamin leitet sich vom ursprünglich angenommenen Aufbau aus acht transmembranen Segmenten (lat. octo = acht) sowie der Annahme ab, dass diese Proteine als Anionenkanäle fungieren (Yang et al. 2008). Heutzutage ist bekannt, dass die Proteine dieser Familie Homodimere sind, deren Monomere jeweils aus zehn transmembranen Helices und einer zytosolischen Domäne bestehen (Falzone et al. 2018). Zudem fungieren die Proteine nicht nur als wie ursprünglich angenommen calcium-abhängige Chloridkanäle (CaCC) (Yang et al. 2008), sondern auch als Phospholipid-Scramblasen (Suzuki et al. 2010) oder als duale nicht-selektive Ionenkanäle/Phospholipid-Scramblase (Yu et al. 2015).

Aktuell sind zehn verschiedene Proteine (TMEM16A-K exklusive I) bekannt (Falzone et al. 2018). Tabelle 3 fasst die jeweilige Funktion der Mitglieder der Familie zusammen.

Die physiologische Rolle der Anoctamine ist vielschichtig und noch nicht bei allen abschließen geklärt. Anoctamin 6 (TMEM16F) spielt beispielsweise eine Rolle in der Kontrolle der Blutgerinnung. Durch ein defektes Anoctamin 6 wird das Scott-Syndrom, eine seltene angeborene Störung der Gerinnung durch Thrombozyten mit hämorrhagischen Episoden, ausgelöst (Suzuki et al. 2010).

Tab. 3: Übersicht der Mitglieder der TMEM16/Anoctamin-Familie mit Funktion

Anoctamin/TMEM16	Funktion
Anoctamin 1/TMEM16A	CaCC (Yang et al. 2008)
Anoctamin 2/TMEM16B	CaCC (Yang et al. 2008)
Anoctamin 3/TMEM16C	Phospholipid-Scramblase (Suzuki et al. 2013)
Anoctamin 4/TMEM16D	Phospholipid-Scramblase (Suzuki et al. 2013)
<b>Anoctamin 5/TMEM16E</b>	<b>CaCC und Phospholipid-Scramblase (Yu et al. 2015)</b>
Anoctamin 6/TMEM16F	CaCC und Phospholipid-Scramblase (Suzuki et al. 2010, Yu et al. 2015)
Anoctamin 7/TMEM16G	Phospholipid-Scramblase (Suzuki et al. 2013)
Anoctamin 8/TMEM16H	unklar
Anoctamin 9/TMEM16J	Phospholipid-Scramblase (Suzuki et al. 2013)
Anoctamin 10/TMEM16K	unklar

### 1.5.2 Anoctamin 5

Anoctamin 5 (TMEM16E) wird vor allem in Herz- und Skelettmuskelzellen und dem Knochen exprimiert (Mizuta et al. 2007). Wie auch die anderen Anoctamine ist Anoctamin 5 ein Homodimer, dessen jeweilige Monomere aus 10 transmembranen Segmenten besteht. Die calcium-bindende Stelle der Monomere befindet sich jeweils inmitten des Proteins, ist aber von der zytoplasmatischen Seite erreichbar. Jedes Monomer hat eine der Membran zugewandte hydrophile Grube, welche in den Ionen- und Lipidtransport eingebunden zu sein scheint (Chandra et al. 2019).

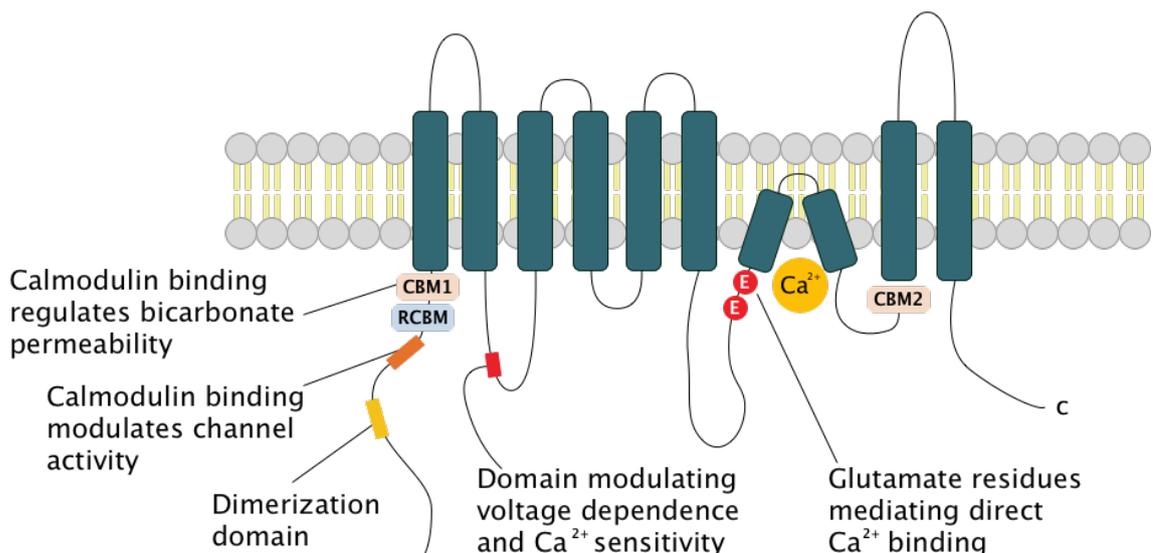


Abb. 3: Schematische Darstellung von Anoctamin 5 (nach Benarroch et al. 2017)

Ursprünglich wurde angenommen, es handle sich wie bei anderen Anoctaminen um einen calciumaktivierten Chloridkanal (Yang et al. 2008). Neuere Untersuchungen

lassen aufgrund der hohen Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen von Anoctamin 5 und Anoctamin 6 jedoch annehmen, dass Anoctamin 5 zusätzlich Eigenschaften einer Phospholipid-Scramblase besitzt und somit möglicherweise bifunktional wie Anoctamin 6 agiert (Whitlock et al. 2018). Der direkte Nachweis im Muskel ist allerdings aufgrund fehlender geeigneter kommerzieller Antikörper gegen Anoctamin 5 noch nicht gelungen (Falzone et al. 2018).

Die physiologische Rolle von Anoctamin 5 ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Anders als im Mausmodell, in dem sich zusätzliche Anhaltspunkte auf eine Beteiligung von Anoctamin 5 bei der Muskeldifferenzierung und Membranreparatur zeigten (Griffin et al. 2016), scheint humanes Anoctamin 5 nicht an der Fusion von Myoblasten oder der Myogenese beteiligt zu sein (Jaiswal et al. 2007), sodass eine speziesspezifische Funktion von Anoctamin 5 möglich erscheint (Chandra et al. 2019).

Zudem wird eine Rolle in der Strukturhaltung des endoplasmatischen Retikulums und in der intrazellulären Calciumhomöostase diskutiert (Chandra et al. 2019). Bei einem Defizit an Anoctamin 5 zeigte sich eine Fehlregulierung des Abbaus von verletzungsbedingt erhöhtem zytoplasmatischem Calcium. Nachfolgend kommt es zu einer vermehrten Fragmentation des endoplasmatischen Retikulums (Chandra et al. 2019). Auch wurde bereits früher beobachtet, dass durch eine intrazelluläre Calciumerhöhung Stress am endoplasmatischen Retikulum ausgelöst wird und somit zur Bildung von tubulären Aggregaten führt (Ikezoe et al. 2003). Auch eine Beteiligung an Signalwegen der Strukturproteine des Sarkolemmes und regulatorischer Proteine wurde überlegt (Penttilä et al. 2012). Darüber hinaus scheint durch einen loss-of-function von Anoctamin 5 die Fusion von Muskelprogenitorzellen gestört (Whitlock et al. 2018). Das Zellwachstum im Muskel sowie die Zelldifferenzierung scheinen bei einem Funktionsverlust von Anoctamin 5 nicht gestört zu sein (Chandra et al. 2019).

Wie bereits beschrieben führt eine rezessive Mutation im *ANO5*-Gen zum klinischen Bild einer Muskeldystrophie mit erhöhter CK und mit oder ohne Myalgien (Bolduc et al. 2010). Durch eine dominante Mutation entsteht das klinische Bild der gnathodiaphysealen Dysplasie, einer seltenen Skeletterkrankung mit vermehrter Knochenbrüchigkeit und Veränderungen am knöchernen Ober- und Unterkiefer (Mizuta et al. 2007).

## 1.6 Amyloid

### 1.6.1 Amyloidproteine

Amyloidproteine bestehen aus mehreren Homopolymeren in einer Cross-Beta-Formation (Eisenberg und Sawaya 2017). Amyloide besitzen einen äußerst variablen Phänotyp mit variabler Toxizität (Qiang et al. 2017).

Die Synthese des Amyloids durchläuft mehrere Phasen und kann entweder über eine Down-Hill-Polymerisation (Hurshman et al. 2004) oder oder wenn sich Proteine in Assoziation mit dem Zellkern konformativ umformen (nucleated conformational conversation) (Lee et al. 2011) erfolgen.

Nicht alle Amyloide sind toxischer Natur. Es gibt darüber hinaus auch funktionale Amyloide. Bei diesen ist die Aggregation stark aufeinander abgestimmt und reguliert. Die pathologischen Amyloide entziehen sich dieser Regulation (Chuang et al. 2018).

Aufgaben der funktionalen Amyloide sind verschieden. Chaperone wie Hsp70 und Hsp90 sind wichtige Inhibitoren der Amyloidentstehung (Lindberg et al. 2015).

Weitere Aufgaben sind beispielsweise die Pigmentformation in der Haut durch das Premelanosome protein (PMEL), welches am Melanin-Meatbolismus beteiligt ist (Watt et al. 2013). Ebenfalls regulieren funktionale Amyloide die mRNA-Translation in Neuronen durch das Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein (CPEB3) (Chuang et al. 2018).

Die Pathogenität von Amyloiden ergibt sich nach Juncker und Walker durch ihre hohe thermodynamische Stabilität (Jucker und Walker 2013). In der Folge kommt es zu einer Akkumulation der Proteine und einer Störung der Proteostase.

Verschiedene neurodegenerative Erkrankungen sind mit pathologischen Amyloidablagerungen assoziiert. Hierzu zählen zum einen Morbus Alzheimer, die frontotemporale Demenz (FTD) Chorea Huntington oder die Familiäre Amyloid Polyneuropathie (FAP) (Chuang et al. 2018).

Darüber hinaus sind pathologische Amyloide nicht ausschließlich neurotoxisch. Beispielweise wurde 2011 durch Westermarck et al. die Degeneration von Beta-Zellen des Pankreas durch Amylin bei Diabetes Typ II beschrieben (Westermarck et al. 2011).

Warum die verschiedenen pathologischen Amyloide unterschiedliche Toxizitäten besitzen, ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt hierzu mehrere Vermutungen:

- a) direkt toxische Wirkung der Amyloidfibrillen und der fehlgefalteten Oligomere (Chuang et al. 2018)
- b) Loss-of function durch Fehlfaltung der nativen Proteine (Chuang et al. 2018)

- c) Auslösung des natürlichen Zelltods durch fehlgefaltetes Amyloid (Olzsha et al. 2011)
- d) Gain-of-toxicity durch Amyloid oder Oligomere (Chuang et al. 2018).

Der Abbau von Amyloid erfolgt über zwei Wege. Zum einen durch Autophagie, bei der die Amyloidaggregate von Autophagosomen umgeben werden. Ein weiterer Abbauweg erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) (Chuang et al. 2018).

### **1.6.2. Vorkommen von Amyloid bei Muskelerkrankungen**

Das Vorkommen von Amyloid bei Muskelerkrankungen wurde bereits vor der Entdeckung der Ablagerungen bei Anoctamin-5-Myopathie festgestellt.

Die Amyloidmyopathie wurde bereits erstmalig 1998 von Spuler et al. beschreiben. Es handelt sich hierbei um eine Erkrankung mit kongophilen Ablagerungen um die intramuskulären Blutgefäße und in Skelettmuskelfasern. Zudem wurden einige nekrotische und Regeneratfasern sowie milde Denervierungszeichen beschrieben (Spuler et al. 1998). Eine Voraussetzung für die Diagnose einer Amyloidmyopathie ist der Ausschluss einer systemischen Amyloidose, welche durch die zusätzliche Anwesenheit einer monoklonalen Gammopathie, Hinweisen auf Amyloidablagerungen außerhalb des Muskelgewebes und Organomegalien in der klinischen Untersuchung oder im CT sowie einer peripheren Neuropathie (klinisch oder im ENG) definiert wird (Liewluck und Milone 2017). Sowohl klinisch als auch ätiologisch besteht eine hohe Heterogenität der Amyloidmyopathie. Amyloidablagerungen im Muskelgewebe wurden jedoch auch bei anderen Muskelerkrankungen gefunden, z.B. bei genetisch bedingten Myopathien mit Mutationen in den Genen für Anoctamin 5 und Dysferlin (Liewluck und Milone 2017). Auch bei der sporadischen Einschlusskörperchenmyositis sind Amyloidablagerung in der Muskulatur typisch (Amato et al. 2009).

## 2 Zielstellung der Arbeit

Die Anoctamin-5-Myopathie ist eine Erkrankung mit einem variablen klinischen und histologischen Erscheinungsbild. Die Pathogenese der Erkrankung sowie die physiologische Rolle von Anoctamin 5 sind bis heute weiterhin nicht eindeutig geklärt. Ziel dieser Arbeit ist es daher, 12 konsekutive Patientinnen und Patienten der neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Halle hinsichtlich ihrer klinischen, epidemiologischen sowie der histologischen, genetischen und proteomischen Auffälligkeiten zu untersuchen, um so ein besseres Verständnis der Pathogenese zu erlangen. Insbesondere sollte untersucht werden, inwiefern sich aus der Literatur bekannte histologische Besonderheiten reproduzieren lassen und ob Amyloidablagerungen und/oder mitochondriale Auffälligkeiten mit epidemiologischen Eigenschaften oder bestimmten muskulären proteomischen Mustern assoziiert sind.

Folgende Fragen sollen durch diese Arbeit geklärt werden:

- Welche Heterogenitäten gibt es klinisch, histologisch, molekulargenetisch sowie auf Proteomebene bei den Hallenser Patienten?
- Welche Unterschiede gibt es in der Proteinexpression im Muskelgewebe bei Patienten mit *ANO5*-Mutation im Vergleich zu gesunden Kontrollen?
- Spiegelt sich der Schweregrad des klinischen und histologischen Bildes von Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie in der Proteinregulation im Proteom des Muskels wider?
- Sind Unterschiede der Proteinexpression in Subgruppen der Patienten mit Anoctamin-5 Myopathie zu finden?
- Ist eine mögliche Pathogenese der Erkrankung anhand der Proteinanalyse im Muskel ableitbar?

## **3 Patienten und Methoden**

### **3.1 Patientenkollektiv**

Untersucht wurde eine Kohorte an Patientinnen und Patienten, welche sich in der Vergangenheit zur Muskeldiagnostik am Muskelzentrum des Universitätsklinikums Halle/Saale vorstellten. Die klinischen Daten wurden retrospektiv ausgewertet.

Das Patientenkollektiv umfasst insgesamt 4 Patientinnen und 8 Patienten mit nachgewiesener rezessiver Mutation im *ANO5*-Gen. Unter den 12 Patientinnen und Patienten befindet sich ein Brüderpaar (PID3 und PID 9).

Alle Patienten erhielten im Rahmen der Diagnostik ein EMG. Bei 8 Patienten lag ein MRT-Befund der Muskulatur vor. Eine Lungenfunktion wurde bei 4 Patienten durchgeführt. Bei 5/11 Patienten wurde eine transthorakale Echokardiographie durchgeführt.

### **3.2. Histologie**

#### **3.2.1 Probenakquise**

Die Muskelbiopsien erfolgten im Rahmen der zurückliegenden Routinediagnostik. Folgende Muskeln wurden hierbei biopsiert:

M. biceps brachii (n=5), M. gastrocnemius (n=2), M. quadriceps femoris, vastus lat. (n=3) sowie M. tibialis anterior (n=1). Von einer Probe war der Biopsieort nicht bekannt.

Alle Muskeln wurden in einem offen-chirurgischen Verfahren entnommen und sofort bei -80°C gelagert. Nachfolgend erfolgte das Schneiden am Gefriermikrotom Leica CM 3050 S (Leica Microsystems, Deutschland) bei -20°C. Anschließend wurden die histologischen und immunhistochemischen Färbungen durchgeführt.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchungen von 3 Patienten erfolgte am Institut für Pathologie der Universität Halle-Wittenberg durch Prof Holzhausen.

Die Entnahme der Muskelproben der Kontrollen erfolgte offen-chirurgisch im Rahmen routinemäßiger orthopädisch-unfallchirurgischer Operationen. Die Aufarbeitung und Lagerung sowie Übersendung der Teilstücke der Kontrollproben entspricht derer der Patientenproben.

### 3.2.2. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Die Färbungen erfolgten bereits im Anschluss an die jeweiligen Muskelbiopsien durch die Mitarbeiter des Muskellabors der neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Halle.

#### *Hämatoxylin-Eosin*

Nach der Entnahme und dem Schneiden der Muskelpräparate werden die Muskelschnitte gefärbt. Für die HE-Färbung werden die Schnitte zunächst für 10min in eine Hämalan-Lösung gestellt. Es erfolgt das Spülen mit Leitungswasser, bis das Wasser klar ist. Danach folgt für 10min das Bläuen in Leitungswasser und daraufhin das Färben mit Eosin 1% für 5min. Nach einem erneuten kurzen Spülen mit Leitungswasser, durchlaufen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe (70% Alkohol, 96% Alkohol, 2x absoluter Alkohol).

#### *Van Gieson-Färbung*

1-3 Tage nach Entnahme werden die luftgetrockneten 10µm dicken Schnitte für 5min in Weigerts Eisenhämatoxylin für 5min gefärbt. Es erfolgt das Spülen mit Aqua. Gefolgt von der Differenzierung des Zellplasmas durch Salzsäurealkohol (70%iger Isopropanol+25% Salzsäure) für 3sec. Hiernach erfolgt die erneute Spülung mit Aqua und nachfolgend das Bläuen in Leitungswasser für 15min. Danach wird erneut mit Aqua gespült. Die Färbung durch das Gieson-Gemisch (20ml gesättigte Pikrinsäure+2ml 1%ige Säurefuchsinlösung) erfolgt für 1min. Nach dem erneuten Waschen mit Aqua durchlaufen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe (96%iger Alkohol, 2x absoluter Alkohol).

#### *Kongorot*

Für die Kongorotfärbung werden die luftgetrockneten Schnitte zunächst in der Hämatoxylin-Lösung nach Goll III für 5min gefärbt und anschließend mit Leitungswasser gespült und für 5min in Leitungswasser gebläut. Es folgt die Inkubation in Stammlösung I und II für jeweils 30min. Danach werden die Schnitte 2x für jeweils 2min in absoluten Alkohol gestellt.

#### *COX/SDH*

Die 10µm dicken Schnitte (Poly-L-Lysin beschichtet) werden bis kurz vor der Färbung bei -80°C gelagert und erst kurz vor der Färbung auf Zimmertemperatur erwärmt. Vor der Färbung werden die Schnitte mit dem Diamantschreiber umkreist.

50µl des Inkubationsmediums werden auf die Objektträger aufgetragen und für 60min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nachfolgend erfolgt die Spülung mit 0,05M Natrium-Phosphatpuffer (pH7,4) und die erneute Inkubation in einer feuchten Kammer

für 60min bei 37°C. Die SDH-Lösung wird aus 100µl 130mM Natrium-Succinat, 100µl 2mM PMS, 10µl 100mM Natrium-Azid und 800µl 1,875mM NTB hergestellt. Nach der Reaktion durchlaufen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe (96%iger Alkohol, 2x absoluter Alkohol).

#### *Gomori-Trichrom*

Für die Trichrom-Gomori-Färbung werden die Schnitte vor der Verarbeitung auf Zimmertemperatur gebracht und danach 10min in Hämatoxylin gestellt. Es folgt das Spülen mit Leitungswasser und anschließendes Bläuen ebenfalls in Leitungswasser für 10min. Anschließend werden die Schnitte für 20min in die Gomori-Lösung gestellt. Danach werden die Schnitte für 5min in 0,2% Essigsäure gestellt. Hiernach werden die Schnitte mit Aqua dest gespült und kurz in 96% Alkohol und danach je 2min in absoluten Alkohol gestellt.

Für das Trocknen werden die Schnitte aller hier aufgeführten Färbungen jeweils 2x 5min unter dem Abzug in Xylol eingestellt und anschließend mit dem Roti Histokitt II eingedeckt.

### **3.2.3 Auswertung**

Die lichtmikroskopische Auswertung der Proben erfolgte am Mikroskop Axioplan (Zeiss) mit dem Okular Zeiss-Plan-NEOFLUAR (5x, 10x, 20x, 40x, 100x). Die angewendete Software war Axio Vision Version 3.1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland).

## **3.3. Massenspektrometrie**

### **3.3.1 Aufarbeitung der Muskelproben für die Massenspektrometrie**

Die Aufbereitung der Muskelproben sowie die massenspektrometrische Analyse erfolgte in Kooperation mit dem Team von Dr. Oliver Klein am BIH Center for Regenerative Therapies der Charité Universitätsmedizin Berlin. Dazu wurden die Proben auf Trockeneis übersendet und nachfolgend gemeinsam aufgearbeitet.

Das durchschnittliche Gewicht der versendeten Teilstücke der Muskelproben beträgt 32,94g.

#### *Homogenisieren der Muskelproben*

Nach Versendung der Proben auf Trockeneis wurden diese umgehend unter Kühlung mittels flüssigen Stickstoffs mit dem ebenfalls heruntergekühlten Probenpuffer P mit

Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zerkleinert. Die gemörserten Proben mit dem Probenpuffer wurden in ein vorgekühltes Eppi überführt und zum Auftauen auf Eis gestellt.

Es folgte die weitere Zerkleinerung der Proben durch Ultraschall (10x15 sec, Gerät: Digweed, DurtyCicle 60%, outputControl 7, 4°C). Nach jedem Ultraschall wurde jede Probe wenige Sekunden herunterzentrifugiert und für ca. 1-2 min auf Eis gestellt. Es erfolgte eine die Zugabe von Benzoase und P-MgCl<sub>2</sub>. Daraufhin wurden die Proben erneut für 1 Stunde auf Eis gestellt. Zu den Suspensionen wurden im Anschluss 6.5M Harnstoff und 2M Thioharnstoff gewichtsadaptiert hinzugegeben und 10min auf dem Magnetrührer gerührt. Danach wurden die Proben nochmals für 10min bei Raumtemperatur stehen gelassen. 5µl jeder Probe wurden auf einen Amicon-Filter 10kDa pipettiert (Amicon-Filter vorher mit 2x50µl mM ABC-Puffer anfeuchten). Nacheinander wurden nun zu jeder Probe 200µl und zweimal 100µl 50mM ABC-Puffer zugegeben. Zwischen jedem Hinzufügen wurden die Proben bei 14.000 U/min bei 20°C für 20min (nach Zugabe von 200µl ABC-Puffer) sowie zweimal 10min (nach Zugabe von jeweils 100µl ABC-Puffer) zentrifugiert.

#### *Tryptischer Verdau*

Ein Vail Trypsin (Sequencing Grade, Modified Trypsin, Porcin; entsprechen 20µg) werden in 90µl kaltem 50mM ABC-Puffer gelöst. Hiervon wurden jeweils 40µl auf den Amiconfilter pipettiert. Für den Verdau wurden die Proben über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### *ZipTip C18*

Nach dem tryptischen Verdau wurden die Proben am Folgetag zunächst für 10min bei 14.000U/min bei 20°C zentrifugiert. Nachfolgend wurden erneut 50µl des 50mM ABC-Puffers zu den Proben gegeben und bei 14.000U/min für 20min bei 20°C zentrifugiert. Es folgt die Einengung der Proben für 1h30min (durchsichtiges Pellet am Boden jedes Tubes sichtbar). Die Pellets werden in 40µl 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) gelöst. 20µl der Proben wurden als Backup eingefroren, die anderen 20µl werden mit ZipTip C18 nach dem Standardprotokoll des BCRT Berlin entsalzt.

Die Proben werden nach dem ZipTip C18 erneut im SpeedVac für 10min eingeeengt und in 10µl 0,1% TFA aufgenommen.

Die Proben werden erneut aufgeteilt: 1. MS-Vail 2µl Probe in 0,1% TFA + 8µl 0,1% TFA (1:5 verdünnt); 2. MS-Vail 8µl Probe in 0,1% TFA und bis zur Analyse mittels Massenspektrometrie bei -20°C gelagert.

(Analyse in Anlehnung an Ma et al. 2003)

### 3.3.2 Proteomics Analyse der aufgearbeiteten Proben

Für die Identifikation der Proteine mittels Massenspektrometrie (MS) wurden aufbereiteten Proben mit exakt 100µl Trypsinlösung (20µl, 100mM Ammoniumbicarbonat) über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die anschließende Messung mittels nUPLC-MS/MS wurden die Peptide mit 20µl 0,1%-iger TFA extrahiert (15 min Inkubation bei Raumtemperatur).

1µl jedes Peptidextrakts wurden auf einem 2-44%igen Acetonitril-Gradienten in 0,1%-iger Ameisensäure unter Nutzung einer analytischen C18 Analysesäule (Acclaim PepMap RSLC column 100 A, 75µm id 150 mm, 2µm particle size, Thermo Fisher Scientific) und einer Säule (C18, 5µm, 100 A, 300 µm i.d. x 5mm, Thermo Fisher Scientific) bei einer Flussrate von 300nl/min über 60min aufgetrennt. Die UPLC (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific) wurde mittels einer Elektrospray-Quelle (bruker daltonics) an eine ESI-QTOF-MS (Impact II, bruker daltonics) angeschlossen. Die Spannung für die Ionisation betrug 1600 V, die Temperatur der Quelle 150°C.

Die Aufnahme erfolgte im MS Modus „Daten-abhängiger Analyse“ (DDA; data dependent analysis).

*Einstellungen am Massenspektrometer:*

Scanbreite 150-2200 Da

Spektraten: MS-Modus: 2Hz; MS/MS-Modus: 4000-16.000 Hz

Cycle Time (QTOF Reflektionsanalysator): 3 sek.

### 3.3.3 Protein-Identifizierung und Markierungsfreie Quantifizierung

Die Proteinidentifizierung und Markierungsfreie Quantifizierung wurden mittels Peaks Studio Proteomics Software Version 10.6 analysiert. Anschließend wurden für die Identifizierung eine PEAKS de novo Sequenzierung und im Anschluss eine Datenbandanalyse mittels folgenden Parameter durchgeführt:

De-novo Sequenzierung

Parent Mass Error Tolerance: 20.0 ppm, Fragment Mass Error Tolerance: 0.05 Da, Enzyme: Trypsin, Variable Modifications: Oxidation (M), Deamidation (NQ) und Acetylation (N-term), Max Variable PTM Per Peptide: 3.

### *Datenbanksuche*

Search Engine Name: PEAKS, Parent Mass Error Tolerance: 20.0 ppm, Fragment Mass Error Tolerance: 0.05 Da, Precursor Mass Search Type: monoisotopic, Enzyme: Trypsin, Max Missed Cleavages: 3, Digest Mode: Specific, Variable Modifications: Oxidation (M), Deamidation (NQ) und Acetylation (N-term), Max. Variable PTM Per Peptide: 3, Database: UniProt\_SwissProt, Taxon: Homo sapiens (human Searched Entry 20418) Der Peptid-Signifikanzfilter wurde auf  $-\lg P > 20$ , der Protein-Signifikanzfilter auf  $-\lg P > 15$  und der Unique-Peptid-Filter auf 1 gesetzt.

### *Quantifizierung*

Eine markierungsfreie Quantifizierung mit PEAKS Q wurde mit folgenden Parametereinstellungen durchgeführt:

Quantification type: Label free quantification; LFQ method: Feature based; LFQ Mass Error Tolerance: 10.0 ppm; Retention Time Shift Tolerance; 1.0 min; FDR Threshold: 1%.

Der Protein-Signifikanzfilter wurde auf  $< 0.05$ , der Protein-Fold-Filter auf 1.5 und der Unique-Peptid-Filter auf 1 gesetzt. Die Peptid-Features mussten mindestens 1x/Gruppe und mindestens 1x/Probe nachgewiesen werden.

### **3.3.4 Gruppierung der Proteine und Pathway-Analyse**

Die in der Proteomanalyse fehlregulierten Proteine wurden zunächst anhand ihrer jeweiligen Funktionen in Gruppen unterteilt. Hierbei wurden zunächst die Proteine berücksichtigt, welche bei den Patienten mit nachgewiesener Anoctamin-5-Myopathie im Vergleich zur Kontrolle um das 1,5-fache vermehrt oder 0,6-fach vermindert waren. Im Vergleich wurden dann die Gruppen berücksichtigt, welche aus mindestens zwei Mitgliedern bestanden. Diese Gruppen wurden in einem weiteren Schritt auch für den Vergleich zwischen den Subgruppen verwendet. Einen Sonderfall bildet das Transthyretin, welches zu den Degenerationsmarkern gehört und im Rahmen der Amyloidose eine besondere Rolle spielt.

Anschließend wurde eine Pathway-Analyse mittels der Bioinformatikdatenbank String durchgeführt, in der sich verschiedene Assoziationen zwischen den veränderten Proteinen nachweisen ließen.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Klinische Phänotypen**

Das Alter zum Erkrankungsbeginn lag bei den Patienten im Durchschnitt bei 41 Jahren (n=11). Männer waren früher betroffen als Frauen. Durchschnittlich erfolgte 7 Jahre (n=11) nach Symptombeginn die Muskelbiopsie. Laborchemisch waren die CK-Werte 2-50fach erhöht.

Von 11 der 12 Patienten lagen klinische Daten vor: Hierbei präsentierten 7 Patienten eine Gliedergürteldystrophie, 1 Patient hatte eine distale Myopathie und 1 Patient einen generalisierten Phänotyp. Bei 2 Patienten fanden sich keine Paresen, sondern eine isolierte Hyper-CK-ämie mit Myalgien. Myalgien wurden von insgesamt 5/11 Patienten angegeben.

### **4.2 Elektromyographie**

Die vorliegenden EMGs der Patienten waren bei allen Patienten myopathisch verändert, d.h. es zeigten sich kurze Summenpotenziale mit kleiner Amplitude und erhöhter Polyphasierate. Darüber hinaus zeigten 4 Patienten zudem aktive Denervierungszeichen im Sinne von Fibrillationen, Faszikulationen und pathologischer Spontanaktivität.

Tab. 4: Zusammenfassung der klinischen Patientendaten; m=männlich; w=weiblich; J=Jahre; LGMD=Gliedergürteldystrophie; MMD=distale; gen = generalisiert; Myopathie; oE=obere Extremitäten; uE=untere Extremitäten; - = keine Daten vorhanden

PID	Sex	Alter bei Onset	Erkrankungsdauer bis Biospie (J)	Phänotyp	CK-Erhöhung (x-fach des Normwertes)	EMG-Befunde
1	m	40	3	LGMD	15-50	chron. myopathische Veränderungen
2	w	64	5	LGMD	22	myopathische Veränderungen
3	m	22	28	LGMD	2-12	-
4	m	23	6	MMD	12	chron. myopathische Veränderungen
5	w	52	3	hyper CK	3-7	-
6	m	59	7	LGMD	27	-
7	w	16	9	hyper CK	15	myopathische Veränderungen paravertebral und M. vastus lat.
8	m	26	25	gen	16	myopathische Veränderungen paravertebral und M. vastus
9	m	-	-	-	-	-
10	m	40	18	LGMD	17	myopathische und neuropathische Veränderungen nebeneinander
11	w	50	0	LGMD	13	grenzwertig myopathische Veränderungen im M. vastus med.
12	m	64	10	LGMD	3	myopathische Veränderungen

### 4.3 Magnetresonanztomographie

Insgesamt erhielten 8 Patienten ein MRT der Muskulatur. In 4 Fällen lag ein VerlaufsmRT vor.

Allen gemeinsam war eine asymmetrische Atrophie und teilweise fettige Degeneration bis Dystrophie. Bei 2 Patienten wurden zudem auch dystrophische Veränderungen der Schultermuskulatur beschrieben. Die autochthone Rückenmuskulatur war bei 2 Patienten atrophiert.

Tab. 5: Ergebnisse der MRT-Untersuchungen; oE=obere Extremitäten; uE=untere Extremitäten; - = keine Daten vorhanden

PID	MRT-Befunde
1	Asymm. Atrophie und dystrophe Veränderungen in multiplen Muskeln der oE, uE und autochthonen Rückenmuskulatur
2	-
3	stärkste Degeneration der dorsalen OS&US im Verlauf langsam fortschreitend (li>re; Zeitraum 8 Jahre)
4	Signalanhebung im M. gastrocnemius links
5	Dystrophische Veränderungen im dorsalen US bds. sowie M. quadrizeps li
6	Atrophien in Schulter- und Oberschenkelmuskulatur
7	Kaliberschwache Beugemuskulatur im OS, im Verlauf auch Glutealmuskulatur betroffen sowie M. gastrocnemius li (Zeitraum 7 Jahre)
8	Atrophien und Ödeme in OS und US bds. (re>li); im Verlauf fortschreitend (Zeitraum 3 Jahre)
9	-
10	fettige Atrophie in OS und US, im OS nur noch Restfasern vorhanden
11	-
12	-

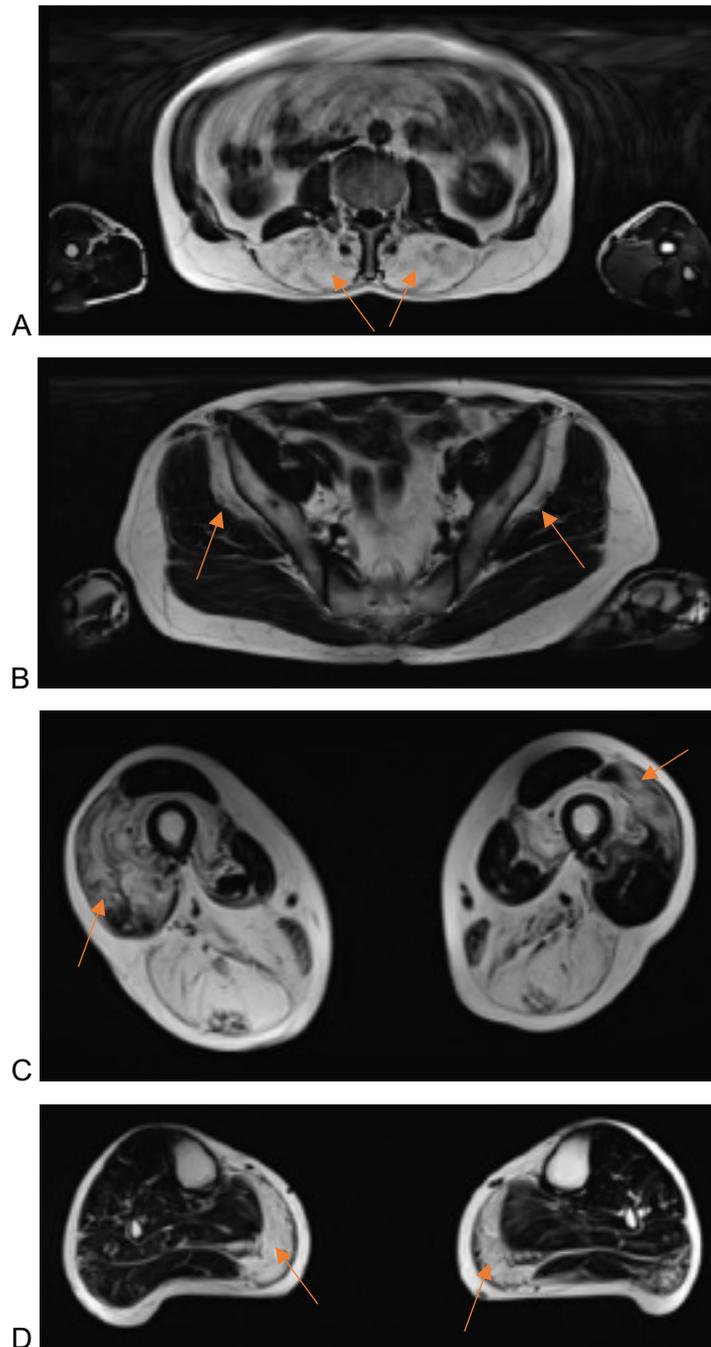


Abb. 4: MRT-Bilder von PID 8 (Dixon-fat). A: Fettiger Umbau der lumbalen Rückenmuskulatur (Pfeile); B: Atrophie des M. gluteus minimus bds. (Pfeile); C: Asymmetrische Atrophie der Oberschenkelmuskulatur (Pfeile); D: Atrophie der Unterschenkelmuskulatur (Pfeile)

#### 4.4 Kardio-pulmonale Umfelddiagnostik

In der transthorakalen Echokardiographie konnte bei keinem Patienten eine Minderung der linksventrikulären Ejektionsfraktion nachgewiesen werden. Bei einem Patienten mit einer arteriellen Hypertonie waren zu dem eine konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie sowie eine gering- bis mittelgradige Dilatation des linken Vorhofs nachgewiesen worden, die am ehesten im Rahmen der Hypertonie gewertet wurden. Von 6 Patienten lagen EKG-Befunde vor, die alle keinen Anhalt für Herzrhythmusstörungen gaben.

Die Lungenfunktionsdiagnostik zeigte bei 2 Patienten auffällige Parameter: Bei einer Patientin (PID7) ergab sich eine gering verminderte Stärke der Atemmuskulatur ( $P_{0,1}$  74% von Normal, MV 84% von Normal). Eine Verlaufskontrolle dieser Patientin lag leider nicht vor. Eine auffällige Lungenfunktionsuntersuchung eines anderen Patienten mit bekannter chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD Grad III) zeigte eine verminderte FeV1 und VC (im Verlauf trotz Medikation zunehmend).

#### 4.5 Histologie

Für alle 12 Patienten lag ein Muskelbiopsieergebnis vor. In der HE-Färbung zeigten alle Patienten ein myopathisches Gewebesyndrom mit abgerundeten Muskelfasern, einem erweiterten Faserkaliberspektrum und einer Vermehrung von binnenständigen Zellkernen, wie beispielhaft in Abbildung 7a dargestellt. Darüber hinaus zeigten 7/12 Biopsien eine sukzessive Enzymverteilungsstörung in der SDH-Färbung als weitere unspezifische myopathische Veränderung (Abbildung 7b).

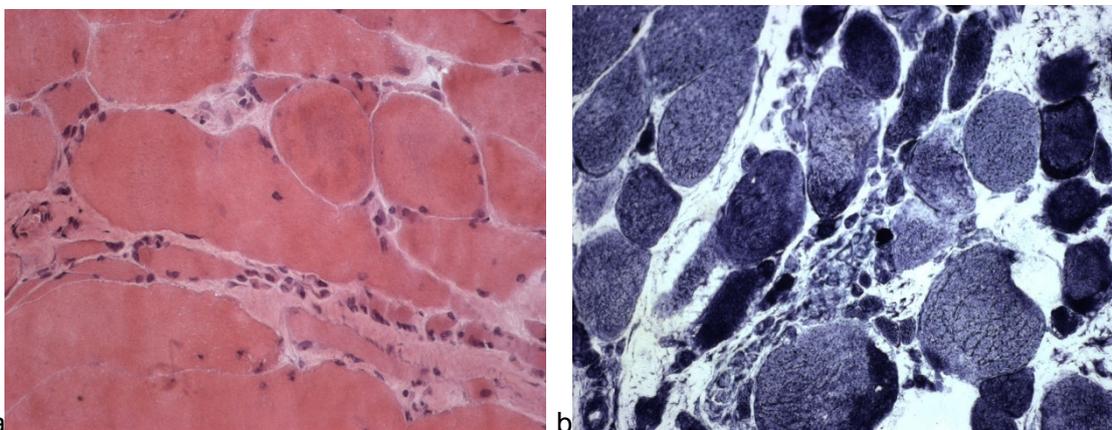


Abb.5: Unspezifische myopathische Veränderungen in PID4 - a) HE-Färbung mit binnenständigen Zellkernen und abgerundeten Fasern, Vergrößerung 20fach. b) SDH-Färbung mit Enzymverteilungsstörung, Vergrößerung 20fach.

In der Kongorotfärbung konnte bei 9/12 Patienten Amyloid nachgewiesen werden, welches sich im polarisierten Licht typischerweise apfelgrün darstellte (Abbildung 8).

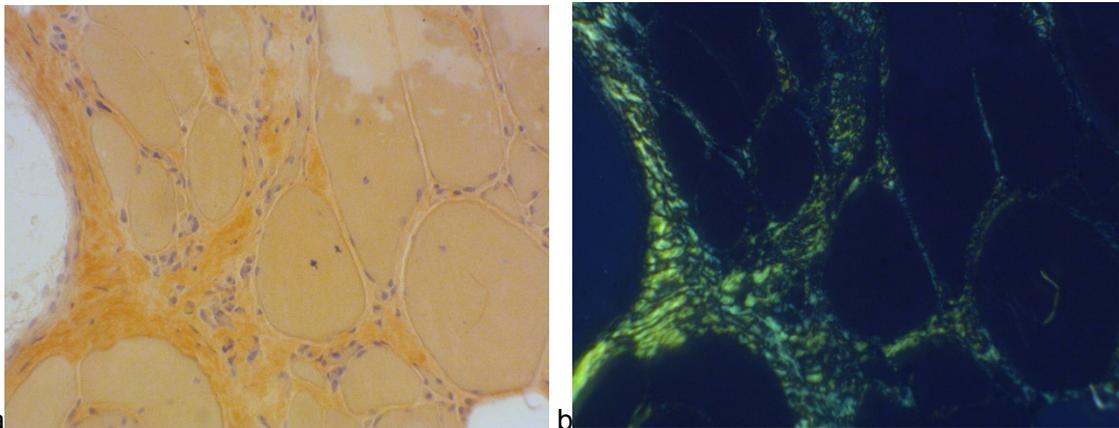


Abb. 6: Amyloidablagerungen in PID4, Vergrößerung 20fach. – a) Kongorotfärbung b) Amyloid im polarisierten Licht, Vergrößerung 20fach.

Mitochondriale Auffälligkeiten konnten bei 7/12 Patienten gefunden werden. Es waren bei 7 Patienten Fasern mit negativer Reaktion gegenüber der Cytochrom-C-Oxidase auffällig, wie in Abbildung 9a dargestellt. Bei einem Patienten zeigten sich zusätzlich starke subsarkolemmale und plasmatische Mitochondrienakkumulationen, die als ragged red fibres bezeichnet werden, wie in Abbildung 9b dargestellt.

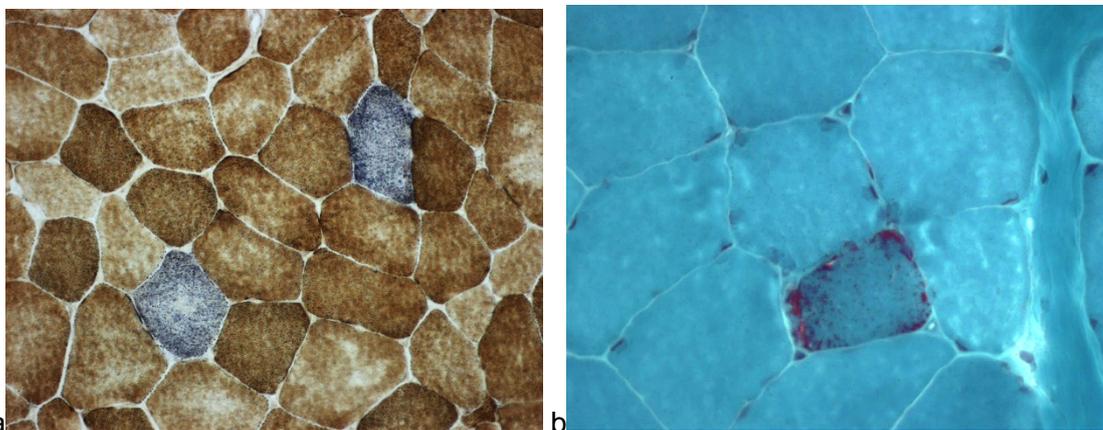
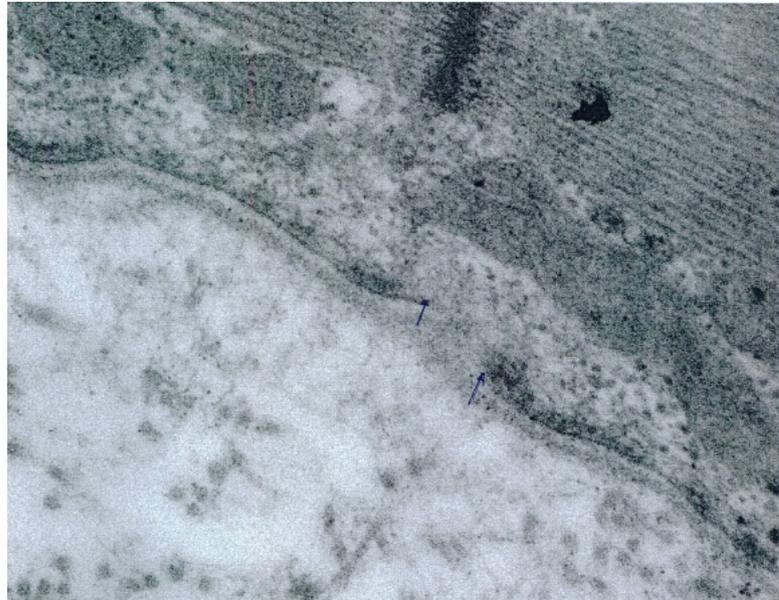


Abb. 7: Mitochondriale Auffälligkeiten in PID3, Vergrößerung 20fach. – a) COX/SDH Färbung mit COX-negativen Fasern (blau). b) Trichrom-Gomori-Färbung: ragged red fibre, Vergrößerung 20fach.

Bei 7/12 Patienten war in den Schnitten das interfaszikuläre Bindegewebe vermehrt. Muskelfasernekrosen fanden sich bei einem Patienten. Die Ergebnisse der myohistologischen Untersuchung sind in Tabelle 6 auf Seite 27 zusammenfassend dargestellt.

#### 4.6 Elektronenmikroskopie

Bei 3 Patienten lag darüber hinaus ein elektronenmikroskopischer Befund vor. Hierbei waren für die Anoctamin-5-Myopathie typische Plasmamembrandefekte bei 2 Patienten nachweisbar (Abb. 10). Bei dem dritten Patienten fanden sich keine Auffälligkeiten.



*Abb. 8: Ultrastruktureller Nachweis von Plasmamembrandefekten bei Anoctamin-5-Myopathie in PID3, Vergrößerung 30'000fach, dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Prof. Holzhausen (Institut für Pathologie Universitätsklinikum Halle (Saale))*

Tab. 6: Myohistologische Befunde: - = unauffällig; (+) = gering; + = vermehrt; ++ = hochgradig vermehrt

PID	Muskel	Hämatoxilin-Eosin (HE)	Amyloid	SDH	Gomori-Trichrom	COX-neg. Fasern	Bindegewebsvermehrung
1	MG	moderate myopathische Veränderungen Verbreiterung des Bindegewebes	+	-	eine Faser mit Vakuolen	+	+ (HE)
2	MBB	moderate myopathische Veränderungen	+	reduzierte Enzymaktivität	-	++	(+) (V. Gieson)
3	MVL	myopathische Veränderungen und viele Regeneratfasern	+	subsarkolemmale Enzymakkumulation	ragged red fibers	+	(+) (V. Gieson)
4	MG	ausgeprägte myopathische Veränderungen, nekrotische Fasern	+	-	-	(+)	+ (V. Gieson)
5	MTA	milde myopathische Veränderungen	+	fokales Enzymdefizit	-	-	(+) (V. Gieson)
6	MVL	moderate bis starke myopathische Veränderungen	+	einige Fasern mit reduzierter Enzymaktivität	-	-	+ (V. Gieson)
7	MVL	milde myopathische Veränderungen	+	einige Fasern mit prominenter subsarkolemmaler mitochondrialer Enzymaktivität	-	-	- (V. Gieson)
8	MBB	milde myopathische Veränderungen keine Bindegewebswucherung	+	partiell reduzierte Enzymaktivität	-	-	- (HE)
9	MBB	myopathische Veränderungen und viele Regeneratfasern	+	-	-	+	- (V. Gieson)
10	unbekannt	moderate myopathische Veränderungen keine Bindegewebswucherungen	-	-	erhöhte Mitochondrienanzahl	+	- (HE)
11	MBB	milde myopathische Veränderungen	-	-	-	-	- (HE)
12	MBB	dystrophe Veränderungen mit lobulierten Fasern	-	Typ-1-Muskelfasern mit subsarkolemmaler Enzymakkumulation	einige Fasern mit Vakuolen	+	++ (V. Gieson)

#### 4.7 Genetische Charakterisierung

Genetisch lag bei den meisten Patienten (11/12) die Mutation c.191dupA auf mindestens einem Allel des ANO5-Gens vor. Vier dieser Patienten waren homozygot, 7 Patienten waren compound heterozygot. Bei einem Patienten war die Mutation c.2387C>T auf einem Allel im ANO5-Gen nachweisbar. Auf dem anderen Allel konnte bis dato keine mit einer ANO5-Myopathie assoziierte Mutation gefunden werden. Eine Patientin (PID 7) wies zusätzlich eine GAA-Mutation (IVS1-12T>G) im Gen der Glukosidase Alpha auf. Als rezessive Mutation ist die mit der Glykogenose Typ 2 (M. Pompe) assoziiert.

Tab. 7: Übersicht über die Mutationen der Patienten mit Anoctamin 5-Myopathie der Hallenser Kohorte;  
*m=männlich, w=weiblich*

PID	Sex	Mutation
1	m	c.191dupA/c.817C>T
2	w	c.191dupA/c.191dupA
3	m	c.191dupA/c.1898+1G>A
4	m	c.191dupA/p.R758C
5	w	c.191dupA/c.155A>G
6	m	c.191dupA/c.191dupA
7	w	c.191dupA/c.191dupA
8	m	c.191dupA/c.119+1G>T
9	m	c.191dupA/c.1898+1G>A
10	m	c.191dupA/c.1643C>T
11	w	c.191dupA/c.191dupA
12	m	heterozygot c.2387C>T

## 4.8 Proteomics

Im Vergleich zu den Kontrollbiopsien zeigten sich bei den Patienten mit Anochtamin-5-Myopathie verschiedene Proteine fehlreguliert.

Die Zuordnung der Proteine (s. Kapitel 3.3.4) erfolgte in folgende Gruppen:

- 1) Zytoskelett und Muskelkontraktion
- 2) Stoffwechsel
- 3) Genregulation
- 4) Calciumstoffwechsel
- 5) Degenerationsmarker

### *Zytoskelett und Muskelkontraktion*

In der Gruppe der Proteine des Zytoskeletts und der Muskelkontraktion ergab der Vergleich der Patientengruppe mit den Kontrollen, dass Actin (ACTN) sowie mit ihm interagierende Proteine wie Twinfilin-2 (TWF2) und Moesin (MSN) bei den Patienten mit Anochtamin-5-Myopathie im Vergleich zu den Kontrollen vermehrt exprimiert werden. Dies ließ sich ebenfalls für Myoglobin (MB) sowie verschiedene Ketten von Myosin (MYH 2, MYL6B, MYL6B, MYL6B, MYL6B) beobachten. Herunterreguliert waren bei den Patienten hingegen Elastin (ELN), Prolargin (PRELP), Tenascin-X (TNXB), Biglycan (BGN), Thrombospondine (THBS1, THBS4) sowie das Cartilage intermediate layer protein (CLIP) und Decorin (DCN).

### *Stoffwechselprozesse*

In der Gruppe der an Stoffwechselprozessen beteiligten Proteine waren bei den Patienten mit Anochtamin-5-Myopathie mehrere Enzyme des Glucose- und des Fettstoffwechsels fehlreguliert. Im Rahmen des Glucosestoffwechsels waren dies die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBP2; Gluconeogenese), die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; Glykolyse) sowie die Lactatdehydrogenase (LDHA; anaerobe Glykolyse) heraufreguliert. Die Carnitin-O-Palmitoyltransferase (CPT1; Betaoxidation) war ebenfalls vermehrt exprimiert. Darüber hinaus waren sowohl die Proteinkinase A (PRKACA; allgemeine Phosphorylierung) als auch die Adenylatkinase 1 (AK1; ATP-Metabolismus) heraufreguliert. Das Mitochondrial 2-Oxoglutarat/Malat Carrier Protein (SLC25A11; Malat-Aspartat-Shuttle) war herunterreguliert.

### *Genregulation*

In der Gruppe der an der Genregulation beteiligten Proteine waren mehrere Histone und Proteasome bei den Patienten heraufreguliert.

### *Calciumhomöostase*

Von den an der Calciumhomöostase beteiligten Proteinen sind die SERCA (ATP2A1), das Sarcalumenin (SRL), das S100-Calciumbindende Protein A (S100A1) und das Synaptophysin-like protein (SYPL2) bei den Patienten mit ANO5-Mutation vermehrt exprimiert.

### *Transthyretin*

Auffällig war, dass bei den Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie das Transthyretin (TTR) ebenfalls erhöht war.

Tab. 8: Proteinveränderungen im Muskel von Patienten mit nachgewiesener **ANO5-Mutation im Vergleich zum Kontrollmuskel**

Gruppierung der Proteine	Heraufreguliert	Herunterreguliert
<b>Zytoskelett und Muskelkontraktion</b>	Actin (ACTN) Twinstillin-2 (TWF2) Moesin (MSN) Myoglobin (MB) Myosin (MYH2, MYL6B, MYLPP)	Elastin (ELN) Thrombospondin (THBS1 und THBS4) Biglycan (BGN) Cartilage intermediate layer Protein 1 (CILP) Prolargin (PRELP) Tenascin-X (TNXB) Decorin (DCN)
<b>Stoffwechsel</b>	Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBP2) Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Lactatdehydrogenase (LDHA) Carnitin-O-Palmitoyltransferase (CPT1) Proteinkinase A (PRKACA) Adenylatkinase 1 (AK1)	Mitochondrial 2-Oxoglutarat/Malat Carrier Protein (SLC25A11)
<b>Genregulation</b>	Histone 60S ribosomal protein L9 (RPL9)	
<b>Calciumhomöostase</b>	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (ATP2A1) Sarcalumenin (SRL) S100 Calciumbindendes Protein A (S100A1)	
<b>Degenerationsmarker</b>	Transtyretin (TTR)	

Die bioinformatische Analyse mittels der String Datenbank (*String-db.org*) verdeutlicht die bekannten oder angenommenen Assoziationen zwischen den Proteinen (Abbildung 11).

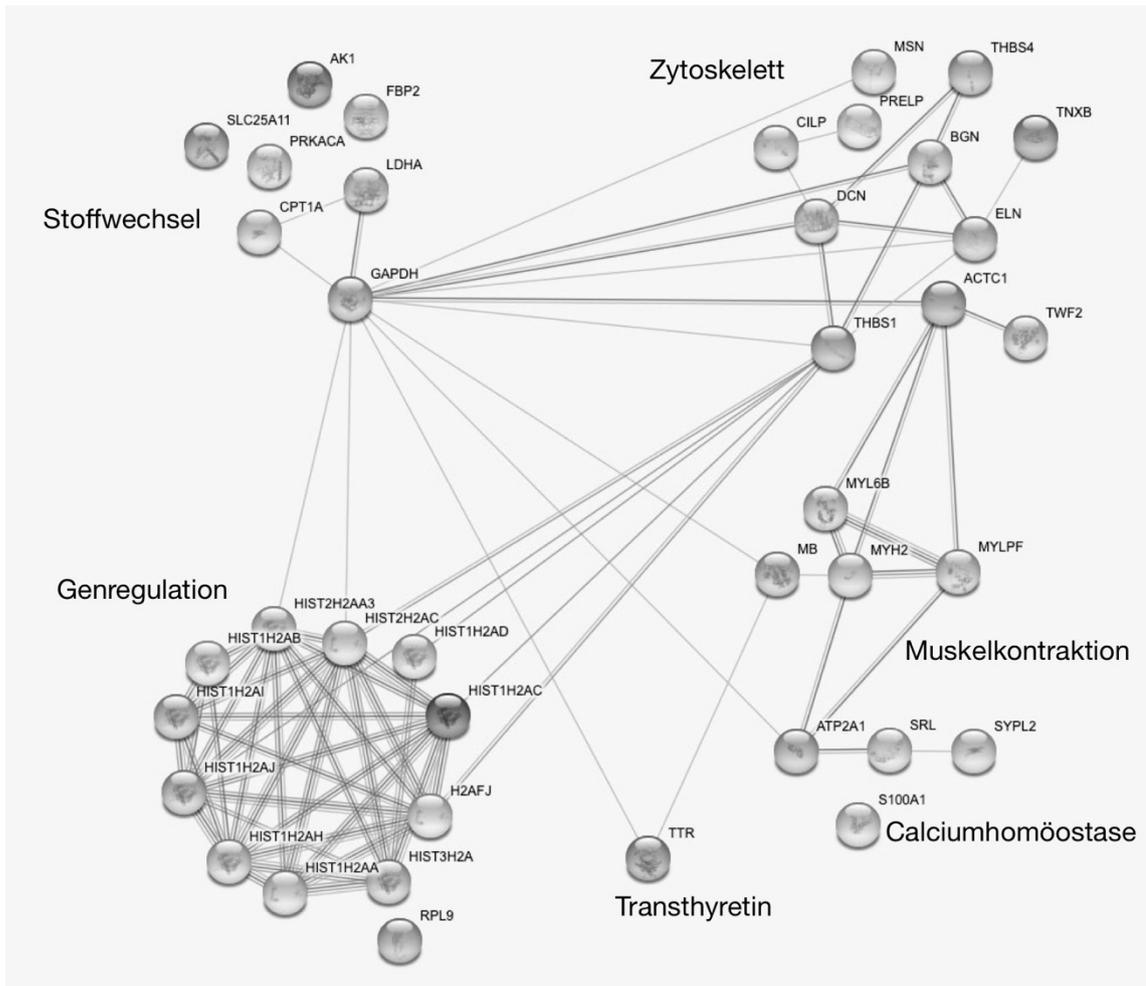


Abb. 9: Pathwayanalyse der fehlregulierten Proteine im Muskel von **Patienten mit ANO5-Mutation im Vergleich zu Kontrollmuskel** (Assoziationen: Literatur, Datenbanken und experimentell ermittelt) (erstellt mit String-db.org)

#### 4.8.1 Subgruppenanalysen

Die Ergebnisse der Subgruppenanalyse von Muskelproben von Patienten mit ANO5-Mutation und Amyloidablagerungen im Vergleich zu Muskelproben von Patienten ohne Amyloidnachweis sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab. 9: Proteinveränderungen im Muskel von **Patienten mit ANO5-Mutation und Amyloidnachweis im Vergleich zu den Proben von Patienten ohne Amyloidnachweis**

Gruppierung der Proteine	Heraufreguliert	Herunterreguliert
<b>Zytoskelett und Muskelkontraktion</b>	Kollagene Kreatinkinase B (CKB) Keratin (KRT1) Tropomyosin (TPM2, TPM3) Myosin (MYL6B) Actin (ACTA1) Troponin I (TNNI)	Thrombospondin (THBS1 und THBS4) Biglycan (BGN) Cartilage intermediate layer Protein 1 (CILP) Prolargin (PRELP) Spectrin (SPTA1) Tenascin-X (TNXB)
<b>Stoffwechsel</b>	Carnitine-O-Acetyltransferase (CRAT)	Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBP2) ATP-Citrat Synthase
<b>Genregulation</b>		Tryptophan-tRNA ligase (WARS)
<b>Degenerationsmarker</b>	Protein 14-3-3 (YWHAB)	

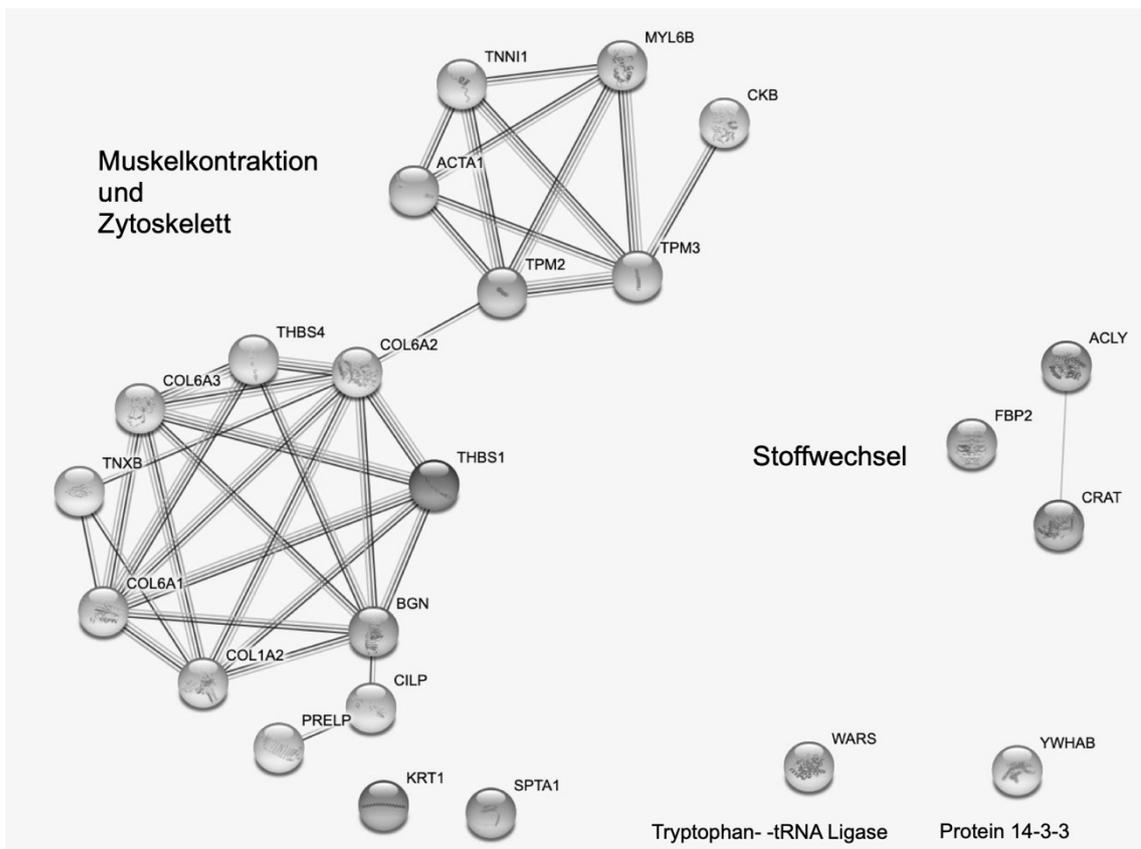


Abb. 10: Pathwayanalyse der fehlregulierten Proteine **der Patienten mit ANO5 Mutation und Amyloidablagerungen im Vergleich zu den Patienten ohne Amyloidnachweis** (Assoziationen: Literatur, Datenbanken und experimentell ermittelt) (erstellt mit String-db.org)

Schließlich erfolgte der Vergleich der Ergebnisse von Muskelproben von Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie, die mitochondriale Auffälligkeiten aufwiesen mit den Proben von diesbezüglich unauffälligen Patienten. Eine zusammenfassende Darstellung liefert Tabelle 10. Auch hier ergaben sich bei den Patienten mit Mitopathie vermehrt Proteine des Zytoskeletts und der Muskelkontraktion sowie Stoffwechsellzyme fehlreguliert. Auffällig war zudem eine vermehrte Expression von Histonen. Bei den Proteinen der Calciumhomöostase war lediglich Sarcocalumenin (SRL) vermehrt exprimiert. Auffällig war ebenfalls die verminderte Expression einiger Hitzeschockproteine. Transthyretin (TTR) und war bei den Patienten mit mitochondrialen Auffälligkeiten weniger exprimiert als bei denen ohne.

Tab. 10: Proteinveränderungen im Muskel von **Patienten mit ANO5-Mutation und mitochondrialen Auffälligkeiten im Vergleich zu Patienten ohne Mitopathie**

Gruppierung der Proteine	Heraufreguliert	Herunterreguliert
<b>Zytoskelett und Muskelkontraktion</b>	Cartilage intermediate layer protein (CLIP) Thrombospondin (THBS4) Prolargin (PRELP) Vinculin (VCL) Keratin (KRT1) Vitronectin (VTN) Dystrophin (DMD) Tenascin-X (TNXB)	Biglycan (BGN) Kollagen VI (COLA6A1, COLA6A3) Myosin (MYL1, MYL6B) Plectin (PLEC) Tropomyosin (TPM1, TPM2) Microtubule-associated protein 4 (MAP4) Profilin-2 (PFN2) Thrombospondin-1 (THBS1) Filamin-A (FLNA) Myosin (MHY2, MYH7) Desmin (DES) Myozenin-2 (MYOZ2) Myoglobin (MB) Actin (ACTC) Elastin (ELN) Troponin (TNNI, TNNT3, TNNC1)
<b>Stoffwechsel</b>	ATP-Citrat-Synthase (ACLY) Apolipoprotein B100 (APOB) Hexokinase-1 (HK1) Pyruvat dehydrogenase Protein X (PDHX)	Carbonic anhydrase 3 (CA3) Carnitin-O-Palmitoyltransferase (CPT1B) ATP-Synthase (ATP5MG) L-lactat Dehydrogenase (LDHA) Fructose-1,6-bisphosphatase (FLNA) Mitochondrial 2-Oxoglutarat/Malat Carrier Protein (SLC25A11) Pyruvatkinase (PKM) Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GADPH) Glucose-6-Phosphat Isomerase (GPI) Fructosebisphosphat Aldolase A (ALDOA)
<b>Genregulation</b>	Histone	
<b>Calciumhomöostase</b>	Sarcalumenin (SRL)	
<b>Degenerationsmarker</b>		Transthyretin (TTR) Protein 14-3-3 (YWHA3)
<b>Hitzeschockproteine</b>		HSPA1A HSPA1B HSPB6

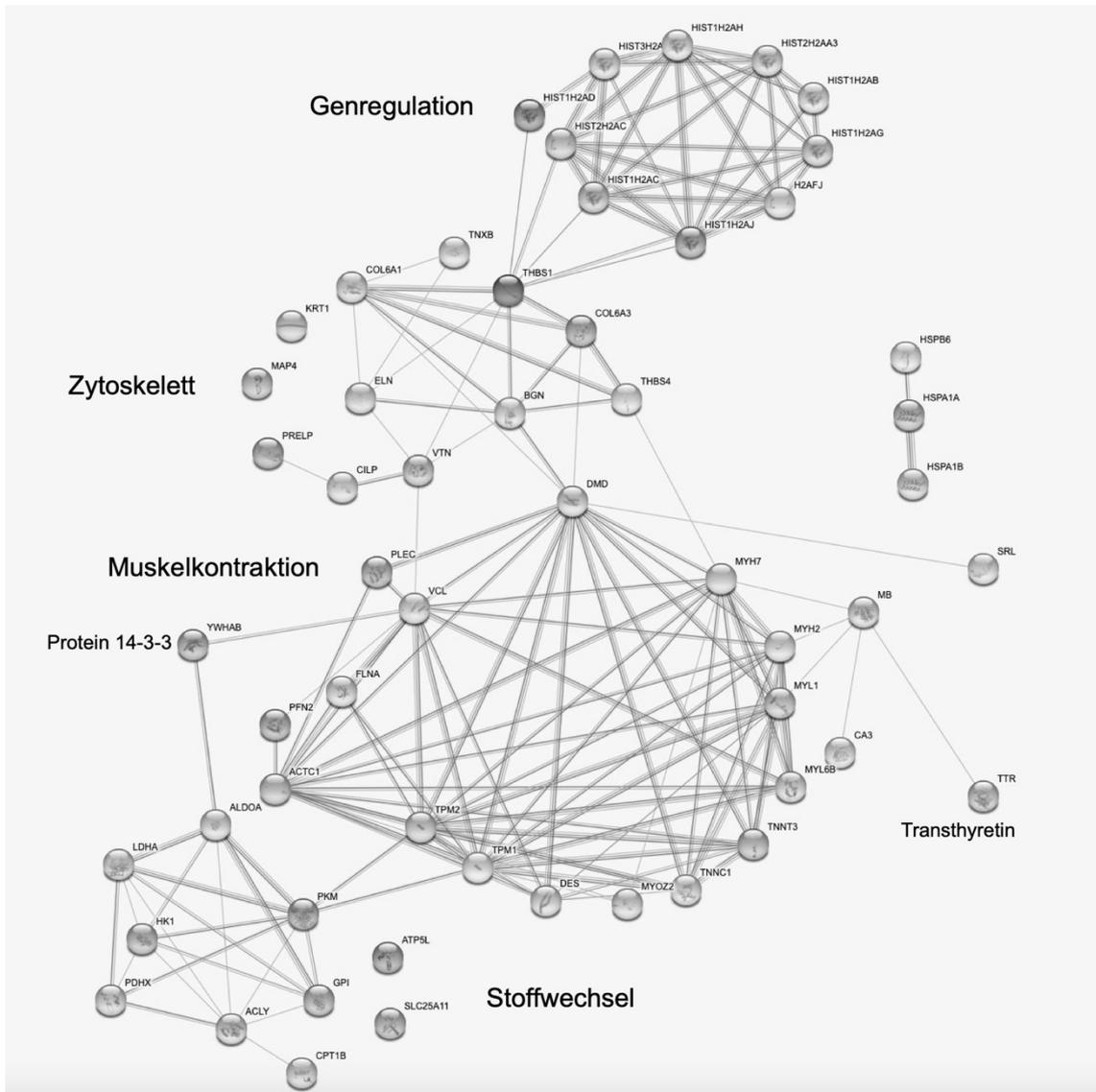


Abb. 11: Pathwayanalyse der fehlregulierten Proteine im Muskel der **Patienten mit ANO5-Mutation und mit mitochondrialen Auffälligkeiten im Vergleich zu denen ohne Mitopathie** (Assoziationen: Literatur, Datenbanken und experimentell ermittelt) (erstellt mit String-db.org)

Zusammenfassend zeigt sich Fehlregulationen in verschiedenen Proteingruppen. Dabei sind folgende Aspekte besonders hervorzuheben:

- 1) Sowohl der Vergleich zwischen den Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie und der Kontrollgruppe als auch die Subgruppenvergleiche zeigten ähnliche Veränderungen in den Proteinspektren
- 2) Im Subgruppenvergleich zwischen Patienten mit und ohne mitochondriale Auffälligkeiten zeigten sich Transthyretin vermindert exprimiert
- 3) In den entsprechenden Pathwayanalysen konnten die Assoziation zwischen den Proteinen der jeweiligen Gruppen verdeutlicht werden

## 5 Diskussion

### 5.1 Klinische Charakteristika

Es ist bekannt, dass die Anoctamin-5-Myopathie einen variablen klinischen Phänotyp hat (Bolduc et al 2010). Die typischen klinischen Präsentationstypen fanden sich dabei auch in der untersuchten Hallenser Kohorte, wobei sich überwiegend das Bild einer Gliedergürteldystrophie (58%) darstellte. Mit einer distalen Myopathie (MMD3) präsentierte sich 1 Patient (8%), ein weiterer Patient zeigte eine generalisierte Schwäche. Eine Hyper-CK-ämie fand sich in 17% der Fälle. Eine ähnliche Verteilung mit Überwiegen des LGMD-Typs mit 67,5% bei 34 Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie ergab sich auch in einer brasilianischen Kohorte. Ein distaler Typ war bei Silva et al. bei 1/34 Patienten bestehend (Silva et al. 2019).

Ebenfalls konnten in der Hallenser Kohorte die Angaben aus der Literatur bestätigt werden, dass vor allem Männer (67%) betroffen sind (Sarkozy et al. 2013). Möglicherweise kann dies daran liegen, dass Frauen eher zu einem leichteren, pseudometabolischen Verlauf mit erhöhter Serum-CK mit und ohne Myalgien neigen und daher unterdiagnostiziert sind (Penttilä et al. 2012; Hicks et al. 2011). Auch in der Hallenser Kohorte waren beide Patienten mit einer isolierten Hyper-CK-ämie weiblich. Unterschiede in der Geschlechterverteilung konnten auch für andere LGMD beobachtet werden. Für die LGMD R1 und LGMD R2 berichteten Fanin und Kollegen ebenfalls über ein vermehrtes Auftreten bei Männern (Fanin et al. 2014).

Das Erkrankungsalter liegt bei der Hallenser Kohorte im Durchschnitt bei 41 Jahren (range 16-64 Jahre) und damit im Rahmen der aus der Literatur bekannten Daten, wo ein Symptombeginn zwischen 34,4 Jahre (Bolduc et al. 2010) und 36,7 Jahren (Penttilä et al. 2012) angegeben wurde.

Grund für die spätere Diagnosestellung könnte sein, dass die Erkrankung histologisch keine spezifischen Phänomene aufweist, sondern die Diagnose genetisch gestellt werden muss. Mit der Einführung der breiteren genetischen Testmöglichkeiten mittels Paneldiagnostik ist hier in der Zukunft möglicherweise eine Verkürzung der Diagnosestellung zu erwarten (Sainio et al. 2022).

Das EMG der Patienten zeigte überwiegend myopathische und teils neurogene Veränderungen. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Arbeit von Silva et al. aus 2019 überein. Darüber hinaus wurden in der Literatur auch myotone Phänomene bei Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie gefunden (Liewluck et al. 2013), die sich in der hiesigen

Kohorte jedoch nicht zeigten. Es ist jedoch bekannt, dass zahlreiche, insbesondere chronische neuromuskuläre Erkrankungen mit myotonen EMG-Veränderungen einhergehen können (Hanisch et al. 2014).

Das Ganzkörper-MRT hat sich als geeignete Methode für den Nachweis von Muskelbefall sowie einer Krankheitsprogression im Verlauf für die Gliedergürteldystrophien und bei zahlreichen anderen Muskelerkrankungen herausgestellt (Warman Chardon et al. 2019). Aus der Literatur ist bei der Anoctamin-5-Myopathie ein Auftreten von unspezifischen STIR-positiven Läsionen in multiplen Muskeln und Lokalisationen innerhalb des Muskels der unteren Extremität bekannt. Zudem zeigte sich bei einem Patienten der Hallenser Kohorte auch eine fettige Atrophie der betroffenen Muskeln, wie bereits aus der Literatur vorbekannt (Holm-Yildiz et al. 2021). Kürzlich zeigten Khawajazada et al. in einer großen Kohorte von 17 Patienten mit Anoctamin-5-Mutation (davon 7 weiblich), dass sich muskuläre Veränderungen besonders schwer bei Männern darstellten und hier bevorzugt die Oberschenkelrückseite, die Adduktoren und die Waden betreffen, während die paraspinale Muskulatur eher gering betroffen scheint. Zudem waren Frauen eher weniger betroffen und hatte Auffälligkeiten vor allem in Form einer fettigen Degeneration der Glutealmuskulatur und an den Waden mit Betonung des medialen Kopfes des M. gastrocnemius (Khawajazada et al. 2021).

Im MRT der Muskulatur von 6 männlichen und 2 weiblichen Hallenser Patienten ließ sich die Betonung der dorsalseitigen Ober- und Unterschenkelmuskulatur nachvollziehen. Ein weitaus geringerer Muskel-Befall bei Frauen, wie in der oben genannten Studie beschrieben, ließ sich im MRT nicht reproduzieren. Dies ist aber vor allem auf die geringe Anzahl an vorhandenen MRT-Befunden von weiblichen Patienten zurückzuführen, da insgesamt nur von 2 der 4 untersuchten Frauen eine Muskel-MRT-Untersuchung vorlag. Insgesamt ist auch in der aktuellen Hallenser Studie ein überwiegend asymmetrisches Bild von Atrophien und dystrophischen Veränderungen zu finden, was die Daten der Literatur bestätigt.

Vereinzelt wurden auch MRT-Auffälligkeiten an den oberen Extremitäten beschrieben (Mahjneh et al. 2010), welche bei der Hallenser Kohorte nur bei einem Patienten nachgewiesen werden konnten.

Eine Beteiligung der autochthonen Rückenmuskulatur konnten nur bei einem männlichen Patienten gefunden werden. Allerdings hatten nur 4/8 Hallenser Patienten ein Ganzkörper-Muskel-MRT. Silva und Kollegen konnten bei der brasilianischen Kohorte zeigen, dass im Ganzkörper-MRT auch die paraspinalen Muskeln bei 8/12 und die abdominalen Muskeln bei 7/12 Patienten auffällig waren. Bei drei dieser 12 Patienten

waren diese Muskelveränderungen schwergradig, ansonsten überwiegend mild bis moderat. Ein Patient der Studie hatte sogar eine ausschließliche axiale Muskelbeteiligung (Silva et al. 2019). Dennoch sind diese Muskelgruppen im MRT insgesamt geringgradiger betroffen, was zum klinischen Bild einer seltenen und eher geringen Beteiligung der paraspinalen Muskulatur bei den Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie passt. Dies unterscheidet die Erkrankung bedeutend von anderen LGMD, zum Beispiel von der autosomal dominant oder rezessiv vererbten Calpainopathie (LGMD R1 und LGMD D4) (Vissing et al. 2020).

Letztlich konnte weder in den eigenen Untersuchungen noch in der Literatur ein pathognomonisches Verteilungsmuster für die Anoctaminopathie oder ein Zusammenhang zwischen MRT-Veränderungen und einem spezifischen Phänotyp dargestellt werden (Sarkozy et al. 2012, Holm-Yildiz et al. 2021, Khawajazada et al. 2021). Darüber hinaus beschrieben Depuydt et al. in ihrer Arbeit eine Zunahme der degenerativen Veränderungen im Muskel von Anoctamin-5-Patienten im Verlauf der Erkrankung (Depuydt et al. 2022). Auch bei den 4 Patienten mit Verlaufs-MRTs zeigte sich in 2 Fällen ein Progress im Krankheitsverlauf.

Auch differenzialdiagnostisch ist das MRT nur begrenzt einsetzbar, da beispielsweise die Betonung der dorsalen Ober- und Unterschenkelmuskulatur bei Anoctamin-5-Myopathie nicht spezifisch für diese Erkrankung ist. Ähnliche Veränderungen ließen sich auch bei einem Patienten mit Calpainopathie nachweisen (Vissing et al. 2020).

Eine Herzbeteiligung der Anoctamin-5-Myopathie wurde bislang nur selten beschrieben. In der Studie von Liewluck et al. 2013 zeigten 3 Patienten Herzrhythmusstörungen. Diese waren zum einen eine Sinusbradykardie, ein paroxysmales Vorhofflimmern sowie ein Patient mit einer paroxysmalen supraventrikulären Tachykardie. Die Herzrhythmusstörungen traten alle vor dem Einsetzen der Muskelschwäche auf (Liewluck et al. 2013). Die vorliegenden EKG-Befunde in der Hallenser Kohorte ergaben keinen Anhalt auf derartige Herzrhythmusstörungen.

Auch die transthorakalen Echokardiographien (TTE), die bei 5/12 Patienten durchgeführt wurden, ergaben keinen Anhalt für eine kardiale Beteiligung im Rahmen der Muskelerkrankung. Es konnten bei 2 Patienten geringgradige Klappenvitien nachgewiesen werden. Wahbi und Kollegen haben 2013 bei 3 Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie linksventrikuläre Dilatationen in der Echokardiographie nachweisen können (Wahbi et al. 2013). Papadopoulos et al. fanden darüber hinaus bei 2 Patienten eine ventrikuläre Dysfunktion (Papadopoulos et al. 2017). All diese echokardiographischen Veränderungen fanden sich in der Hallenser Kohorte nicht. Eine kardiale Beteiligung ist daher als eher selten anzusehen (Papadopoulos et al. 2017).

Ein Befall der Atemmuskulatur ist im Rahmen der Anoctamin-5-Myopathie nicht bekannt (Bouquet et al. 2012). In diesem Kollektiv fand sich eine gering verminderte Stärke der Atemmuskulatur bei einer Patientin (PID7). Bei dieser Frau lag zusätzlich eine heterozygote GAA-Mutation vor, die als homozygote GAA-Mutation zur Glykogenose Typ II (Morbus Pompe) führt. Ein Befall der Atemmuskulatur ist ein charakteristisches Merkmal der Pompe-Erkrankung (Schoser et al. 2015). Da bei dieser Patientin trotz heterozygoter Mutation auch eine gering verminderte Aktivität der alpha-Glukosidase im Trockenbluttest festgestellt wurde, könnte die subklinische Beeinträchtigung der Atemfunktion durch die heterozygote GAA-Mutation bedingt sein (im Sinne einer Pseudodominanz der GAA-Mutation oder durch epigenetische Faktoren).

## **5.2 Histologische Charakteristika**

Wie auch in anderen Arbeiten konnten in den Muskelbiopsien der Hallenser Patienten mit *ANO5*-Mutation überwiegend myopathische Veränderungen wie abgerundete Muskelfasern, ein erweitertes Faserkaliberspektrum und vermehrt binnenständige Zellkerne nachgewiesen werden (Mahjneh et al. 2010, Hick et al. 2011). Darüber hinaus konnte ebenfalls in der SDH-Färbung eine Enzymverteilungsstörung als weiteres myopathisches Merkmal nachgewiesen werden. Die Vermehrung von intramuskulärem Bindegewebe ist ebenfalls für die Erkrankung bekannt (Hick et al. 2011, Liewluck et al. 2013) und wurde bei einem Teil der Patienten aus dieser Studie ebenfalls gefunden. Diese unspezifischen myopathischen Veränderungen kommen bei der Anoctamin-5-Myopathie in verschiedenen Schweregraden ohne Einfluss auf den klinischen Krankheitsverlauf oder Zusammenhang mit einem bestimmten Genotyp vor (Hick et al. 2011, Depuydt et al. 2022). Vereinzelt in der Literatur beschriebene inflammatorische Infiltrate wurden in dieser Untersuchung nicht gefunden (Hick et al. 2011). Wie bereits in einer anderen Arbeit publiziert wurde, zeigten sich bei einem Patienten (PID4) eine Vielzahl von nekrotischen Fasern mit dem Bild einer nekrotisierenden Myopathie (Schneider et al. 2014). Fasernekrosen wurden zudem auch vereinzelt bei anderen Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie gefunden (Milone et al. 2012, Penttilä et al. 2012), sie scheinen aber ein eher seltenes Phänomen zu sein.

Mitochondriale Auffälligkeiten konnten in der aktuellen Untersuchung bei mehr als der Hälfte der Patienten (7/12) nachgewiesen werden. Hierzu zählte insbesondere die Vermehrung der COX-negativen Fasern, die die häufigste mitochondriale Störung darstellten. Im Muskel von PID3 konnten zudem ragged red fibres nachgewiesen

werden. Besonders viele ragged red fibres wurden gemeinsam mit einer Reduktion des Komplex III der Atmungskette bei auch einem von drei Patienten mit ANO5-Mutation in einer kleinen Kohorte von Seguí et al. gefunden, ohne dass Veränderungen der mitochondrialen DNA nachgewiesen wurden (Seguí et al. 2020). Der beschriebene Patient zeigte außerdem eine endomysiale Inflammation und Nekrosen. Vázquez et al. zeigten bei 2/5 Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie subsarkolemmale Mitochondrienansammlungen, die bei einem Patienten ca. 70% der Fasern betrafen (Vázquez et al. 2020). Subsarkolemmale Mitochondrienakkumulationen waren auch ein charakteristisches Merkmal im Maus-Model bei ANO5<sup>-/-</sup>-knockout-Mäusen (Griffin et al. 2016). In den hiesigen Untersuchungen waren subsarkolemmale Enzymakkumulationen eher selten (n= 2) und eine Assoziation von Mitopathie mit entzündlichen Veränderungen wie bei Seguí et al beschrieben, konnten demgegenüber nicht gefunden werden.

Im Elektronenmikroskop sind multifokale Unterbrechungen der Plasmamembran der Muskelzellen typische Veränderungen (Mahjneh et al. 2010), welche auch bei 2/12 Patienten aus dieser Kohorte bereits zuvor nachgewiesen werden konnten (Deschauer et al. 2011) und auch bei anderen Kohorten gefunden wurden (Vázquez et al. 2020).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Beobachtungen der histologischen Veränderungen der Hallenser Kohorte ein gutes Abbild der aus der Literatur bekannten Veränderungen geben. Dennoch stellt der hohe Anteil von Patienten mit mitochondrialen Auffälligkeiten in der Hallenser Kohorte sich deutlich präsenter dar, als bislang in der Literatur beschrieben. Die mitochondriale Pathologie könnte demnach eine Rolle für die klinischen Beschwerden von belastungsinduzierten Myalgien spielen.

### **5.2.1 Histologische Auffälligkeiten bei Patienten mit Amyloidablagerungen**

Das Auftreten von Amyloidablagerungen im Skelettmuskel bei Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie ist schon lange bekannt (Milone et al. 2012, Liewluck et al 2013). In der Tat wird die Anoctamin-5-Myopathie als häufigste Ursache einer isolierten Amyloidablagerung im Skelettmuskel angenommen (Liewluck und Milone 2017).

Der Nachweis von Amyloid gelang bei dem überwiegenden Anteil der Muskelbiopsien in der Hallenser Kohorte und lag bei 9/12 Biopsien (75%). Im Vergleich dazu lag der Anteil an Amyloid-positiven Patienten in einer retrospektiven Analyse bei 8/15 Patienten (53%) mit Anoctamin-5-Myopathie, davon zeigten 4 Patienten kardiale Auffälligkeiten und 4 hingegen keine (Anandan et al. 2019). Die Assoziation von Amyloidablagerungen und

kardialen Pathologien wurde auch in anderen Studien gefunden (Liewluck et al. 2013). In der aktuellen Untersuchung der hiesigen Patienten war jedoch keine Kardiomyopathie nachweisbar. Auch ein bevorzugtes Auftreten von Amyloid bei Männern, wie sie bei Anandan et al. dargestellt wurde, wobei von den 8 Patienten mit Amyloidnachweis nur 1 weiblicher Patient gefunden wurde, stellte sich in der hier untersuchten Kohorte nicht so dar. Bei 3/4 eingeschlossenen Frauen wurde Amyloid in der Muskelbiopsie nachgewiesen. Es fand sich in dieser Studie auch kein Zusammenhang mit einem bestimmten klinischen Phänotyp oder einer bestimmten Mutation, was die Daten aus anderen Studien untermauert (Anandan et al. 2019).

Das Alter der Patienten mit Amyloidnachweis war in der Hallenser Kohorte zum Erkrankungsbeginn mit 37,8 Jahren früher als beim Kollektiv von Liewluck et al. mit 50,7 Jahren, so dass ein physiologischer Alterseffekt als Ursache eher unwahrscheinlich für das häufigere Vorkommen von Amyloid bei den Hallenser Patienten ist. Die Erkrankungsdauer der Hallenser Patienten zum Zeitpunkt der Muskelbiopsie lag im Durchschnitt bei 7 Jahren und war damit möglicherweise länger als bei den Patienten der Kohorte von Liewluck et al., wo jedoch keine diesbezüglichen Angaben aufgeführt wurden (Liewluck et al. 2013).

Allerdings ist es auch möglich, dass Amyloid sowohl im betroffenen Muskel als auch generell in der Skelettmuskulatur nicht gleichmäßig verteilt auftritt, so dass der Amyloidnachweis auch durch einen „Sampling error“ bedingt sein kann (Anandan et al. 2019), weil die Biopsie nur einen sehr kleinen Ausschnitt der Muskulatur zeigt.

Differenzialdiagnostisch muss das vermehrte Auftreten von Amyloid bei den Patienten im Rahmen einer systemischen Amyloidose in Betracht gezogen werden, für die sich jedoch nach den Kriterien von Liewluck und Milone von 2017 bei den Hallenser Patienten kein Anhalt fand (Liewluck und Milone 2017). Zudem spricht der genetische Nachweis der ANO5-Mutation bei der hiesigen Kohorte in Zusammenschau mit der klinischen Präsentation und Krankheitsverlauf für muskuläre Amyloidablagerungen im Rahmen der Anoctamin-5-Myopathie.

Amyloidablagerungen wurden zudem auch bei anderen Muskelerkrankungen nachgewiesen: Bei der Dysferlinopathie handelt es sich um eine autosomal-rezessive Myopathie, die ebenfalls phänotypisch eine Gliedergürteldystrophie (LGMDR2) sowie die Miyoshi-Myopathie (Liu et al. 1998) hervorrufen kann. Hier wurden Amyloidablagerungen bei Patienten in den intramuskulären Gefäßwänden, dem Sarkolemm und im Interstitium des Skelettmuskels gefunden (Spuler et al. 2008, Carl et al. 2009). Da lediglich das N-terminale Ende des Dysferlinproteins in den Amyloidablagerungen nachgewiesen werden konnte, wird vermutet, dass dies unter anderem aus dem nicht abgebauten N-terminalen Ende des durch Mutation

fehlgefalteten Dysferlins bestehen und nicht aus dem vollständigen Protein (Carl et al. 2009). Eine massenspektroskopische Untersuchung von Laserdissekativen der Amyloidablagerungen von 3 Amyloid-positiven Patienten mit ANO5-Mutation von Liewluck et al. hatten im Gegenzug dazu jedoch keine Anoctamin-Fragmente darstellen können (Liewluck et al. 2013).

Auch bei der sporadische Einschlusskörpermyositis (sIBM) ist das Auftreten von Amyloid bekannt. Die sIBM ist eine seltene Form der idiopathischen entzündlichen Muskelerkrankungen. Typischerweise zeigt sich klinisch eine sich nach dem 50. Lebensjahr langsam entwickelnde proximale und distale Schwäche der Extremitäten. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Amato et al. 1996). Charakteristische histologische Merkmale sind endomysiale inflammatorische Infiltrate, eosinophile zytoplasmatische Einschlüsse und Muskelfasern mit einer oder mehreren geränderten Vakuolen (Amato et al. 1996). Amyloidablagerungen konnten vor allem in den Fasern mit Vakuolen nachgewiesen werden (Mendell et al. 1991). Ebenfalls finden sich ragged red fibres sowie COX-negative Fasern, diese könnten jedoch auch sekundärer Natur sein (Griggs et al. 1995). Die Ursache der Einschlusskörper Myositis ist noch nicht abschließend geklärt. Aufgrund des Nachweises der sogenannten „Alzheimer-Proteine“ (z.B.  $\beta$ -Amyloid,  $\beta$ -APP, hyperphosphoryliertes tau, Apolipoprotein E) könnte es sich bei der IBM möglicherweise um eine degenerative Muskelerkrankung handeln (Amato et al. 2009).

### **5.3 Die Genetik der Hallenser Anoctamin-5-Patienten**

Hinsichtlich des genetischen Spektrums zeigte auch die Hallenser Kohorte ein sehr heterogenes Bild ohne Phänotyp-Genotyp-Korrelation. Die ANO5-Mutation c.191dupA lag am häufigsten vor, wodurch die Dominanz dieser Mutation bei der Anoctamin-5-Myopathie in der westlichen Welt widerspiegelt wird, die auf einem Gründereffekt zurückzuführen ist (Hicks et al. 2011). Eine weitere häufige Mutation c.2272C>G tritt vor allem in Finnland auf (Penttilä et al. 2012) und war in diesem Kollektiv nicht nachweisbar.

### **5.4 Das Proteom bei Anoctamin-5-Myopathie**

Die massenspektroskopische Analyse von Muskelgewebe von Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie zeigte eine Vielzahl von fehlregulierten Proteinen im Vergleich zum Kontrollmuskel. Die Proteine ließen sich anhand ihrer physiologischen Funktion ordnen

(Zytoskelett und Muskelkontraktion, Stoffwechsel, Genregulation, Calciumstoffwechsel und Degenerationsmarker).

#### 5.4.1 Proteine des Zytoskeletts

In der Gruppe der Proteine, welche am Zytoskelett beteiligt sind, zeigten sich Actin und die mit ihm interagierenden Proteine Twinfilin-2 und Moesin vermehrt exprimiert. Moesin gehört zur Ezrin-Radixin-Moesin-Familie (ERM) und spielt eine strukturelle und regulatorische Rolle in der Stabilisierung der Plasmamembran-Interaktion durch seine Fähigkeit mit Transmembranproteinen und dem Zytoskelett zu interagieren (Fehon et al. 2010).

Im Muskelgewebe von Mäusen mit Duchenne-Muskeldystrophie (*mdx*<sup>-/-</sup>-Maus) wurde Moesin vermehrt von Myofibroblasten exprimiert, die dystrophische Muskeln infiltrieren und die Hauptquelle von Extrazellulärmatrix bilden (Pines et al. 2017).

Zudem wurden auch erhöhte Moesinlevel sowohl in Muskelfasern von Mäusen mit Dysferlinopathie (*dysf*<sup>-/-</sup>) und CMD (*dy*<sup>2J</sup>/*dy*<sup>2J</sup>) als auch in Biopsien von Patienten mit Duchenne-Muskeldystrophie oder kongenitaler Muskeldystrophie mit Mutation im COL6A3-Gen (Ullrich-Myopathie) oder LAMA2-Mutation (Merosinopathie), die eine Assoziation zu Fibrosearealen mit vermehrter Kollagen I -Produktion aufwiesen, nachgewiesen (Pines et al. 2017). Auch bei Fibrosierungsprozessen in anderen Organen, wie beispielsweise bei der Entstehung einer Nierenfibrose zeigten sich erhöhte Moesinlevel (Chen et al. 2014).

Die Moesinerhöhung in den Muskelproben der Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie ist daher als Ausdruck einer Fibrosereaktion zu werten, wie sie ein typisches Merkmal von Muskeldystrophien darstellt (Thompson und Straub 2016).

Zudem wurde im Mausmodell der Dysferlinopathie auch eine Moesinexpression innerhalb der Muskelfasern nachgewiesen, sodass vermutet wird, dass Moesin hier auch eine Rolle bei der Plasmamembranreparatur spielt (Pines et al. 2017). Auch für die Anoctaminopathie ergaben sich Hinweise für eine gestörte Membranreparatur im Mausmodell der *ANO5*<sup>-/-</sup>-Maus (Griffin et al. 2016), sodass die Moesinerhöhung auch in diesem Rahmen möglich ist. Untersuchungen an Muskelfasern von *ANO5* Knockout-Mäusen zeigten eine verminderte Fähigkeit zur Reparatur von Laser-induzierten Membranschäden bei Anoctamin-5-defizienten Muskelzellen, wobei mit der gestörten Membranreparatur eine Dysfunktion der Bereitstellung des Calcium- und Phospholipid-bindendem Annexins assoziiert war. Diese Beobachtungen lassen eine Lokalisation von Anoctamin 5 an der Plasmamembran vermuten (Foltz et al. 2021).

Eine verminderte Expression zeigte sich zum einen bei Elastin, jedoch auch bei Decorin, Thrombospondin 1 und 4 sowie bei Biglycan und Cartilage intermediate layer protein 1. Die Proteingruppe der Thrombospondine ist an vielen unterschiedlichen biologischen Prozessen beteiligt. Eine Akkumulation von Thrombospondin 1 wurde im Skelettmuskel von Patienten mit Dysferlinopathie beobachtet, wobei diese Heraufregulation zudem mit einer erhöhten chemotaktischen Kapazität und Makrophageninfiltration in Verbindung steht (De Luna et al. 2010, Urao et al. 2016). Da der inflammatorische Anteil im Muskelgewebe der Anoctamin-5-Patienten nicht so ausgeprägt war, könnte dies möglicherweise die Differenz der Ergebnisse erklären.

Thrombospondin 4 spielt eine Rolle beim Strukturhalt und der Funktion von Muskel-Sehnen-Übergängen. In einem Review von Loreti und Sacco zeigen verschiedenen Studien an Mäusen, dass es durch einen Knock-out von Thrombospondin 4 zu einer verringerten Muskelmasse kommen kann (Loreti and Sacco 2022). Die verminderte Expression von Thrombospondin 4 kann daher möglicherweise auch als Marker der Muskeldystrophie und -atrophie sowie der klinischen Muskelschwäche bei den Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie angesehen werden.

Biglycan und Decorin sind leucin-reiche Proteoglykane und wichtige Bestandteile der interstitiellen Extrazellulärmatrix und spielen eine wichtige Rolle in der Kollagensynthese (Seidler et al. 2006). Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen war bei Duchenne-Mäusen die Muskeldystrophie mit einer Hochregulation von Biglycan assoziiert (Bowe et al. 2000).

Decorin ist zudem noch in die Regulation der Zelladhäsion und -migration sowie der Angiogenese involviert. Mit seiner Dermatansulfatkette bindet Decorin an Tenascin-X. Eine Mutation in diesem Protein führt unter anderem zum Ehlers-Danlos-Syndrom (EDS) (Seidler et al. 2006). Ein Funktionsverlust von Decorin und Biglycan führt in Versuchen an Mäusen ebenfalls zu schwerwiegenden Veränderungen an der Haut und den Knochen, welches die beiden am häufigsten betroffenen Gewebe beim EDS sind (Seidler et al. 2006). Aktuell gibt es in keiner bisher erschienen Arbeit Hinweise auf eine Beteiligung der Haut beim Patienten mit Anoctamin-5-Mutation. Der Knochen ist jedoch im Rahmen der durch eine dominante Mutation im *ANO5*-Gen ausgelöste Gnathodiaphyseale Dysplasie betroffen (Mizuta et al. 2007).

Vergleicht man die Ergebnisse der Anoctamin-5-Patienten mit und ohne Amyloidablagerungen untereinander zeigte sich zusätzlich eine verstärkte Hochregulierung von Kollagenen (I und VI). Kollagen VI ist für den Strukturhalt sowie die Differenzierung von Muskelstammzellen bedeutsam (Cescon et al. 2015). Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Störung der Zellarchitektur bei den Patienten mit

Amyloidablagerungen bereits weiter fortgeschritten ist und daher die vermehrte Expression der Kollagene ebenso wie die vermehrte Expression der Proteine des kontraktiven Apparates (Myosin, Actin, Tropomyosin, Troponin I) kompensatorisch erfolgt. Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie und Amyloidnachweis histologisch eine protrahierte Erscheinung der Erkrankung aufweisen.

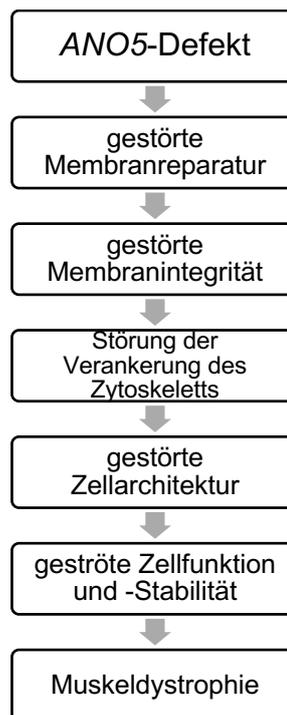


Abb. 12: Flussdiagramm zur Hypothese zur Entstehung der Muskeldystrophie anhand der Veränderungen des **Zytoskeletts** ausgelöst durch Mutation von Anoctamin 5

#### 5.4.2 Proteine des kontraktiven Apparates

Von den Proteinen des kontraktiven Apparates waren bei den Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie Myosinketten erhöht. Im gesunden Mausmuskel zeigten Ohira et al. ebenfalls eine Hochregulation von verschiedenen Myosinen (7,8 und 9) unter einer vermehrten Gewichtsbelastung (Ohira et al. 2020). Möglicherweise kennzeichnet die Hochregulation eine kompensatorische Reaktion der Muskulatur bei den Patienten mit ANO5-Mutation. Demgegenüber ergab sich in der Proteomanalyse von Skelettmuskelproben von Duchenne-Mäusen (mdx-4cv) eine Herabregulation der Proteine des kontraktiven Apparates (Murphy et al. 2019), was möglicherweise damit zu erklären ist, dass es sich bei der Duchenne-Erkrankung um eine rascher progrediente

Form der Muskeldystrophie als bei der Anoctaminopathie handelt und diese mit einer geringen Fähigkeit von muskulären Kompensationsmechanismen einhergeht.

### 5.4.3 Stoffwechsel

Eine weitere Gruppe bilden fehlregulierte Proteine, die an Stoffwechselprozessen beteiligt sind. Von den Veränderungen waren sowohl Proteine der Glykolyse, der Gluconeogenese, der Beta-Oxidation als auch der Atmungskette betroffen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren bei den Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie im Rahmen des Kohlenhydratstoffwechsels die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Glykolyse), die Laktatdehydrogenase (anaerobe Glykolyse) sowie die Fructose-1,6-bisphosphatase (Gluconeogenese) vermehrt exprimiert.

Die Fructose-bisphosphat Aldolase A, die dominante Isoform der Aldolase im Skelettmuskel, katalysiert die reversible Reaktion von Fructose-1,6-bisphosphat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat sowie die Spaltung von Fructose-1-Phosphat zu Glycerinaldehyd (Papadopoulos et al. 2021). Papadopoulos und Kollegen berichten in ihrer Arbeit von zwei Fällen, von periodisch auftretenden Rhabdomyolysen, durch homozygote Mutationen im ALDOA-Gen (Papadopoulos et al. 2021). Bereits zuvor war das Auftreten von Rhabdomyolysen (teilweise mit hämolytischer Anämie) durch Fallstudien bekannt (Kreuder et al. 1996). Eine Verminderung der Aldolase konnte in der hiesigen Kohorte nur in der Gruppe der Patienten mit Mitochondriopathie nachgewiesen werden. Möglicherweise sind die muskulären Veränderungen und der Anstieg der CK bei einigen der Anoctamin-Patienten der Hallenser Kohorte unter anderem auf eine verminderte Expression der Aldolase zurückzuführen.

Auffällig war ebenfalls die Fehlregulation von Enzymen des Fettstoffwechsels und der Atmungskette. Hierbei waren die Veränderungen ebenfalls vor allem in der Gruppe der Patienten mit Mitopathie nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse konnten von Coats und Kollegen anhand einer Proteomanalyse von Herzmuskelgewebe bei Patienten mit hypertroph obstruktiver Kardiomyopathie (HOCM) nachgewiesen werden (Coats et al. 2018). Wie auch bei den Patienten mit Mitopathie waren Enzyme der Beta-oxidation sowie die ADP ATP Translokase und auch Untereinheiten der ATP-Synthase fehlreguliert. Es wird diskutiert, dass eine Störung innerhalb der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung zu einem Fehlen von high-energy-Phosphate in den Zellen führt, wodurch es zu einem verminderten Energiefluss und möglicherweise zu einem Vorantreiben der Erkrankung bei HOCM kommt (Coats et al. 2018). Möglicherweise ist

dies eine Erklärung für die jedoch selten vorkommende Herzbeteiligung im Rahmen der Anoctamin-5-Myopathie. Allerdings waren bei den bisher beschriebenen Fällen dilatative Kardiomyopathien beobachtet worden (Wahbi et al. 2013), die bei den Patienten der Hallenser Kohorte aber nicht aufgetreten waren.

Anhand der Untersuchungen am Skelettmuskel von Duchenne-Mäusen fanden auch Murphy und Kollegen Veränderungen in der Expression mitochondrialer Proteine, welche durch den Verlust von Dystrophin und nachfolgend sekundären Veränderungen in verschiedenen Stoffwechselwegen erklärt wurde (Murphy et al. 2019). Auch in der Arbeit von Griffin und Kollegen konnte in den *ANO5*<sup>-/-</sup>-Mäusen sowohl strukturelle als auch funktionelle Störungen beobachtet werden. Letzteres wurde durch die Messung der Aktivität der Citrat-Synthase festgestellt. Griffin und Kollegen äußern in dieser Arbeit, die Überlegung, dass diese Auffälligkeiten möglicherweise sekundär aufgrund gestörter Membranreparaturprozesse bzw. durch eine gestörte Membranregeneration zustande kommen könnten (Griffin et al. 2016).



Abb. 13: Flussdiagramm zur Hypothese des **gestörten mitochondrialen Energiestoffwechsels durch gestörte Membranprozesse** und sekundäre Auswirkungen auf die Mitochondrien bei loss of function von Anoctamin 5

#### 5.4.4 Genregulation

Hinsichtlich der an der Genregulation beteiligten Proteine war bei den Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie das 60S ribosomal protein L9 sowie verschiedene Histone vermehrt exprimiert. In der Analyse von Duchenne-Mäusen von Murphy und Kollegen waren ebenfalls verschiedene ribosomale Proteine vermehrt exprimiert. Dies wurde als Hinweis auf eine erhöhte ribosomale Proteinsynthese als kompensatorischer Mechanismus gewertet (Murphy et al. 2019). Die Muskelregeneration scheint bei der Anoctaminopathie nicht so ausgeprägt zu sein wie im Rahmen der Muskeldystrophie Duchenne, weshalb bei den Hallenser Patienten die ribosomalen Proteine möglicherweise in geringerem Umfang betroffen sind.

#### 5.4.5 Calciumhomöostase

Bei den Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie waren des Weiteren verschiedene Proteine der Calciumhomöostase fehlreguliert. Es wird angenommen, dass Anoctamin 5 als Mitglied der TMEM16-Familie sowohl als Calcium-aktivierter Chloridkanal sowie als Scramblase fungiert und sowohl für die Membranreparatur als auch für die intrazelluläre Calciumhomöostase bedeutsam ist (Griffin et al., 2016; Jaiswal et al., 2007; Chandra et al. 2019). Eine Hypothese ist, dass es im Rahmen einer Plasmamembranschädigung zur einem massiven Calcium-Einstrom in die Muskelfaser kommt. Die SERCA sorgt physiologischer Weise dafür, dass die intrasarkoplasmatische  $Ca^{2+}$ -Menge reduziert wird, indem sie  $Ca^{2+}$  in das endoplasmatische Retikulum pumpt und somit einen protektiven Effekt auf das Zellüberleben hat. Anoctamin 5 wird dabei eine Lokalisation am ER zugeschrieben, wo es als Chloridkanal eine ausreichende Menge an Anionen für die SERCA bereitstellt. Im pathologischen Fall einer Anoctamin-5-Defizienz kommt es somit zu einer Calciumüberladung der Muskelfaser mit negativen Auswirkungen auf die Membranreparatur und Mitochondrienfunktion (Chandra et al. 2021). Dazu passend zeigte sich der Abfall des intrazellulären Calciumanstiegs nach Verletzung der Plasmamembran in Skelettmuskelfasern von Patienten mit ANO5-Mutation reduziert (Chandra et al. 2019).

Bei murinen C2C12-Myoblasten mit ANO5-Knockout zeigten Phuong und Kollegen in vitro eine verminderte Expression des Dihydropyridin-Rezeptors (DHPR) und der SERCA als Hinweis auf einen gestörten Calcium-Signalweg (Phuong et al. 2019).

Demgegenüber zeigte sich in der Untersuchung der Hallenser Patienten eine vermehrte Expression von SERCA, dem  $Ca^{2+}$ -Shuttle-Protein Sarcalumenin und dem

Calciumbindenden Protein S100. Die Vergleichbarkeit dieser Untersuchungsergebnisse mit denen Zellkulturen von Phuong ist durch die Analyse in unterschiedlichen Modellen nur bedingt gegeben, da bereits bekannt ist, dass sich einige pathologische Phänomene, die beim Menschen beobachtet wurden, beispielsweise nicht in den murinen ANO5-knockout-Modellen (C57BL6/J -Mäuse) rekapitulieren ließen (Xu et al. 2015).

Es ist vorstellbar, dass es bei Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie zu einer vermehrten Expression von den Proteinen der Calciumhomoöstase im Rahmen eines Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Calciumhomoöstase kommt, wobei dies aufgrund der gestörten Funktion von Anoctamin 5 letztlich aber nicht gelingt. Hierzu passen die Proteomuntersuchungen an Skelettmuskeln der Duchenne-Maus (Murphy et al. 2019), die ebenfalls eine Hochregulation von SERCA zeigen konnten.

#### **5.4.6 Hitzeschockproteine**

Ein weiterer interessanter Aspekt war die verminderte Expression von Hitzeschockproteinen bei den Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie mit mitochondrialen Auffälligkeiten. In anderen Arbeiten an IBM-Patienten und Duchenne (mdx-Knock out)-Mäusen zeigten sich diese im Muskel vermehrt exprimiert (Li et al. 2006, Murphy et al. 2019). Hitzeschockproteine unterstützen andere Proteine bei der Faltung und dem Erhalt ihrer Sekundärstruktur (Javid et al. 2007).

Bekannt ist, dass oxidativer Stress einen Pathomechanismus verschiedener Muskelerkrankungen darstellt (Heher et al. 2022). Sowohl bei der Muskeldystrophie Duchenne als auch bei der Dysferlinopathie konnte man eine Peroxidation von Lipiden und eine Oxidation von Proteinen nachweisen. Bei der Dysferlinopathie waren zusätzlich die ROS-Level sowie Antioxidantien erhöht (Terrill et al. 2013). Ebenfalls bekannt ist, dass die Expression von Hitzeschockproteinen von ROS beeinflusst wird. Die genauen Pathomechanismen hierzu sind noch nicht geklärt. In einem Review von Dimauro und Kollegen wurde über mehrere Studien berichtet, bei denen durch die trainingsinduzierte Vermehrung von ROS, Hitzeschockproteine vermehrt exprimiert werden (Dimauro et al. 2016). Möglicherweise liegt der vermehrten Expression von HSP bei der IBM und der Muskeldystrophie Duchenne ein ähnlicher Mechanismus zur Kompensation von erhöhten ROS-Leveln zugrunde.

Hinsichtlich der Anoctamin-5-Myopathie gibt es keine Studien zu den ROS-Leveln im pathologischen Muskel, sodass aktuell nicht sicher nachzuvollziehen ist, durch welchen Mechanismus die HSP bei den Patienten mit Mitopathie vermindert sind. Weitere

Studien an größeren Kohorten sind zum einen aufgrund der geringen Größe der Hallenser Patientengruppe zur Verifizierung der Befunde notwendig. Auch wären Untersuchungen hinsichtlich der ROS-Level bei Anoctamin-5-Myopathie für die weitere Klärung der Zusammenhänge erforderlich.

#### **5.4.7 Transthyretin**

Transthyretin ist ein Transportprotein, welches am Transport des Schilddrüsenhormons Thyroxin sowie dem Transport von Retinol beteiligt ist (Bernstein et al. 2002). Eine Ablagerung von Transthyretin im Gewebe verschiedener Organe führt zur ATTRwt-Amyloidose (senile Amyloidose), die sich vor allem mit einer Kardiomyopathie manifestiert (Ueda et al. 2011). Darüber hinaus ist Transthyretin ein negatives Akute-Phase-Protein, dessen Konzentration sich im Rahmen einer entzündlichen Reaktion verringert (Gulhar et al. 2022). Transthyretin zeigte sich bei den Hallenser Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie im Vergleich zu den Kontrollgruppen vermehrt exprimiert.

In einer RNA-Transkriptom Analyse von Depuydt et al. konnte eine vermehrte Expression von Serum- Amyloid A1 nachgewiesen werden (Depuydt et al. 2022). Dieser Befund gibt in Zusammenschau mit dem Nachweis von Amyloidablagerungen im Muskelgewebe von Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie und der vermehrten Expression von Transthyretin einen weiteren Hinweis auf eine mögliche entzündliche Komponente im Rahmen der Anoctamin-5-Myopathie, für die es auch Hinweise im MRT gibt (Holm-Yildiz et al. 2021).

Unklar ist bis heute weiterhin, welche Rolle entzündliche Reaktion im Rahmen der Entstehung von Muskeldystrophien spielt (Depuydt et al. 2022). Es bleibt fraglich, ob die entzündlichen Veränderungen primär zur Muskeldystrophie führen oder es im Verlauf zu einer chronisch-entzündlichen Reaktion innerhalb des Muskels durch das Einwandern von Makrophagen und Monozyten in diesen und durch die andauernde Verletzungsreaktion kommt (Tidball et al. 2018). Ein Hinweis darauf, dass eine mögliche entzündliche Reaktion im Rahmen der Anoctamin-5-Myopathie sekundär entstehen könnte, lässt sich daraus ableiten, dass bei dem Vergleich der ANO5-Patienten mit den gesunden Kontrollen das Transthyretin erhöht war, während es bei dem Vergleich zwischen den Patienten mit und ohne Mitopathie vermindert exprimiert war, wenn man annimmt, dass sich die Patienten mit mitochondrialen Auffälligkeiten im Vergleich zu denen ohne in einem fortgeschrittenem Krankheitsstadium befinden.

#### 5.4.8 Einordnung der Proteomdaten im Vergleich zur Transkriptomanalyse

In einer rezenten Analyse des Transkriptoms von 16 männlichen Patienten mit einer genetisch gesicherten LGMD R12 fanden Depuydt et al. eine vermehrte Expression von Genen, welche in die Antwort auf Verletzungen und in Immunantworten involviert waren (z.B. Osteopontin, Immunglobulin heavy chain constant gamma). Darüber hinaus waren Muskel-Marker bei den Patienten vermindert exprimiert (Depuydt et al. 2022). Des Weiteren zeigte sich eine vermehrte Expression von fibroadipogenetischen Progenitoren und Kollagenmetabolismus, was als Korrelat einer zunehmenden Fibrose mit fettgewebigen Ersatz, was als Hinweis auf die zunehmende Fibrose mit fettgewebigem Ersatz eingeschätzt wurde und sich auch anhand der Ergebnisse der hiesigen Untersuchung nachvollziehen lässt. Anders als im Falle der Hallenser Patienten ergab die Transkriptomanalyse von Depuydt et al. einer Herabregulation von Markern der Proteinsynthese (ribosomale Gene) und von Genen, welche mit der Atmungskette assoziiert sind.

Als mögliche Ursache können hier vor allem methodische Unterschiede im Studienprotokoll zwischen den Arbeiten angeführt werden.

Es muss dabei festgestellt werden, dass die für die Studie von Depuydt und Kollegen aus Muskelbiopsien extrahierte RNA unter stärker standardisierten Bedingungen gewonnen wurden als die Biopsien der Hallenser Kohorte, bei der ausschließlich diagnostische Muskelbiopsien für die Anoctamin-5-Myopathie ausgewertet wurden. So wurden bei Depuydt et al. nur Männer mit einer genetisch gesicherten LGMD R12 eingeschlossen. In dieser Studie hingegen wurde eine gemischte Kohorte beider Geschlechter und aller Phänotypen (MMD3, HyperCKämie oder Gliedergürteltyp) untersucht.

Auch hinsichtlich der Biopsien erfolgte eine höhere Standardisierung als bei den Hallenser Patienten. So wurden bei Depuydt und Kollegen gematchte Kontrollpatienten und Patienten von drei verschiedenen Proben Muskeln (M. semimembranosus, M. vastus lateralis, M. rectus femoris) entnommen. Die Biopsie der Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie erfolgte nach einem Ganzkörper-Muskel-MRT und unter sonographischer Kontrolle, um eine fettige Degeneration in den Proben zu vermeiden. Auch wurden alle Proben am Morgen und nach einer einwöchigen Pause von intensiver physischer Aktivität entnommen, um einen Unterschied der Genexpression aufgrund des zirkadianen Rhythmus oder dem Einfluss von unterschiedlicher Belastung zu vermeiden. Die Arbeitsgruppe konnte zudem ein progredientes RNA-Expressions-Muster mit zunehmenden Schweregrad des fibrotischen Umbaus, ermittelt im Mercuri-Score des Muskel-MRT-Befundes, nachweisen. Eine diesbezügliche Analyse wurde in der hiesigen

Untersuchung nicht vorgenommen. Depuydt et al. fanden überdies auch in den unterschiedlichen Muskeln von gesunden Kontroll-Patienten verschiedene Muster der Gen-Expression (Depuydt et al 2022).

Aufgrund der Heterogenität der untersuchten Patienten und Muskeln und auch dem Fehlen einer gematchten Kontrollgruppe sind die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar.

## 6 Zusammenfassung

Die untersuchten 12 Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie zeigten eine beeindruckende Variabilität in Klinik, Histologie und Proteom. Gleichwohl konnte keine Korrelation zwischen dem klinischen Schweregrad, der Histologie oder den einzelnen Mutationen hergestellt werden.

Klinisch ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den anhand der histologischen Kriterien eingeteilten Gruppen. Gestützt wird dies ebenfalls durch die ähnlichen Ergebnisse im Subgruppenvergleich in der Proteomanalyse. Kardiale Auffälligkeiten, wie sie in der Literatur beschrieben sind, konnten bei den Hallenser Patienten nicht nachgewiesen werden.

Histologisch waren bei den Hallenser Patienten häufiger Amyloidablagerungen nachweisbar als bisher in der Literatur beschrieben. Klinisch und histologisch waren die Patienten mit Amyloidablagerungen nicht stärker betroffen als die Patienten ohne Amyloidablagerungen, womit die Vermutung bestehen bleibt, dass Amyloid möglicherweise bei allen Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie vorhanden sein könnte und es sich bei den bisherigen Beobachtungen um einen „sampling error“ handelt. Die verminderte Expression von Transthyretin auf der Proteomebene bei den Patienten mit Mitopathie hingegen könnte Hinweise auf eine mögliche sekundäre entzündliche Reaktion im fortgeschrittenen Krankheitsstadium geben, welches sich bei den Hallenser Patienten jedoch klinisch und histologisch nicht reproduzieren ließ.

In der Proteomanalyse zeigten sich darüber hinaus Veränderungen von Proteinen des Zytoskeletts sowie von Proteinen, die am intrazellulären Calciumstoffwechsel beteiligt sind. Beide Beobachtungen unterstützen daher die bisher existierenden Hypothesen zur Lokalisation von Anoctamin 5 an der Zellmembran oder am ER. Die Vielzahl von fehlregulierten Proteinen in der proteomischen Analyse von Muskelgewebe im Vergleich zu den Kontrollen spiegelt einen fibrotischen Umbau wider, in Übereinstimmung mit Befunden aus den Modellen anderer Muskeldystrophien und den Daten einer Transkriptomanalyse bei Anoctamin-5-Myopathie.

Die gestörten Membranprozesse könnten sich sekundär auch über eine Störung der Mitochondrienmembran auf die Proteine des Energiestoffwechsels auswirken und eine Fehlregulation dieser bewirken, welche sich dann histologisch anhand von ragged red fibres und COX-negativen Fasern zeigen. Hinsichtlich der Stoffwechselregulation und der Calciumhomöostase wurden teils widersprüchliche oder diskrepante Daten erhoben, die möglicherweise ihre Ursache in der Heterogenität der Hallenser Kohorte von Patienten mit Anoctamin-5-Myopathie haben.

## 7 Literaturverzeichnis

- Amato AA, Barohn RJ (2009): Inclusion body myositis. Old and new concepts. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 80: 1186–1193
- Amato AA, Gronseth GS, Jackson CE, Wolfe GI, Katz JS, Bryan WW, Barohn RJ (1996): Inclusion body myositis. Clinical and pathological boundaries. *Annals of neurology* 40: 581–586
- Anandan C, Milone M, Liewluck T (2019): Intramuscular interstitial amyloid deposition does not impact anoctaminopathy-5 phenotype. *Muscle & nerve* 59: 133–137
- Angelini, C (2020): LGMD. Identification, description and classification. *Acta myologica: myopathies and cardiomyopathies: official journal of the Mediterranean Society of Myology* 39: 207–217
- Beckmann JS, Richard I, Hillaire D, Broux, O, Antignac, C, Bois, E. et al. (1991): A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 312: 141–148
- Benarroch EE (2017): Anoctamins (TMEM16 proteins). Functions and involvement in neurologic disease. *Neurology* 89: 722–729
- Bernstein LH.; Ingenbleek Y (2002): Transthyretin. Its response to malnutrition and stress injury. clinical usefulness and economic implications. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 40: 1344–1348
- Bolduc V, Marlow G, Boycott KM, Saleki K, Inoue H, Kroon J et al. (2010): Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *American journal of human genetics* 86: 213–221
- Bouquet F, Cossée M, Béhin A, Deburgrave N, Romero N, Leturcq F, Eymard B (2012): Miyoshi-like distal myopathy with mutations in anoctamin 5 gene. *Revue neurologique* 168: 135–141.
- Bowe MA, Mendis DB, Fallon JR (2000): The small leucine-rich repeat proteoglycan biglycan binds to alpha-dystroglycan and is upregulated in dystrophic muscle. *The Journal of cell biology* 148: 801–810
- Bushby KM (1995a): Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies. Report of the ENMC Consortium on Limb-Girdle Dystrophies. *Neuromuscular disorders: NMD* 5: 71–74
- Bushby KM, Beckmann JS, (1995b): The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature. *Neuromuscular disorders: NMD* 5: 337–343.
- Carl M, Röcken C, Spuler S (2009): Amyloidose bei Muskeldystrophie. *Der Pathologe* 30: 235–239
- Cescon M, Gattazzo F, Chen P, Bonaldo P (2015): Collagen VI at a glance. *Journal of cell science* 128: 3525–3531
- Chandra G, Defour A, Mamchoui K, Pandey K, Mishra S, Mouly V et al. (2019): Dysregulated calcium homeostasis prevents plasma membrane repair in Anoctamin 5/TMEM16E-deficient patient muscle cells. *Cell death discovery* 5: 118
- Chandra G, Sreetama S, Chandra M, Davi AG, Charton K, VanderMeulen JH, Richard I, Jaiswal JK (2021): Endoplasmic reticulum maintains ion homeostasis required for plasma membrane repair. *The Journal of cell biology* 220

- Chen YX, Zhang W, Wang WM, Yu XL, Wang YM, Zhang MJ, Chen N (2014): Role of moesin in renal fibrosis. *PloS one* 9
- Chuang E, Hori A, Hesketh CD, Shorter J (2018): Amyloid assembly and disassembly. *Journal of cell science* 131
- Coats CJ, Heywood WE, Virasami A, Ashrafi N, Syrris P, Dos Remedios C et al. (2018): Proteomic Analysis of the Myocardium in Hypertrophic Obstructive Cardiomyopathy. *Circulation. Genomic and precision medicine* 11
- De Luna N, Gallardo E, Sonnet C, Chazaud B, Dominguez-Perles R, Suarez-Calvet X, Gherardi RK, Illa I. (2010): Role of thrombospondin 1 in macrophage inflammation in dysferlin myopathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 69: 643–653
- Deschauer M, Joshi PR, Gläser D, Hanisch F, Stoltenburg G, Zierz S (2011): Muskeldystrophie infolge Anoctamin-5-Mutationen. Klinische und molekulargenetische Befunde. *Der Nervenarzt* 82: 1596–1603
- Depuydt CE, Goosens V, Janky R, D'Hondt A, De Bleecker JL, Noppe N et al. (2022): Unraveling the Molecular Basis of the Dystrophic Process in Limb-Girdle Muscular Dystrophy LGMD R12 by Differential Gene Expression Profiles in Diseased and Healthy Muscles. *Cells* 11: 1508
- Dimauro I, Mercatelli N, Caporossi D (2016): Exercise-induced ROS in heat shock proteins response. *Free radical biology & medicine* 98: 46–55
- Eisenberg DS, Sawaya MR (2017): Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level. *Annual review of biochemistry* 86: 69–95
- Falzone ME, Malvezzi M, Lee BC, Accardi A (2018): Known structures and unknown mechanisms of TMEM16 scramblases and channels. *The Journal of general physiology* 150: 933–947
- Fanin M, Nascimbeni AC, Angelini C (2014): Gender difference in limb-girdle muscular dystrophy. A muscle fiber morphometric study in 101 patients. *Clinical neuropathology* 33: 179–185
- Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A (2010): Organizing the cell cortex. The role of ERM proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11: 276–287
- Felice KJ (2020): Distal Myopathies. *Neurologic Clinics* 38: 637-659
- Foltz SJ, Cui YY, Choo HJ, Hartzell HC (2021): ANO5 ensures trafficking of annexins in wounded myofibers. *Journal of Cell Biology* 220
- Griffin DA, Johnson RW, Whitlock JM, Pozsgai ER, Heller KN, Grose WE et al. (2016): Defective membrane fusion and repair in Anoctamin5-deficient muscular dystrophy. *Human molecular genetics* 25: 1900–1911
- Griggs RC, Askanas V, DiMauro S, Engel A, Karpati G, Mendell JR, Rowland LP (1995): Inclusion body myositis and myopathies. *Annals of neurology* 38: 705–713
- Guglieri M, Straub V, Bushby K, Lochmüller H (2008): Limb-girdle muscular dystrophies. *Current opinion in neurology* 21: 576–584
- Gulhar R, Ashraf MA, Jialal I (2022) Physiology, Acute Phase Reactants. *StatPearls StatPearls Publishing*
- Hanisch F, Kronenberger C, Zierz S, Kornhuber M (2014): The significance of pathological spontaneous activity in various myopathies. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 125: 1485–1490

- Heher P, Ganassi M, Weidinger A, Engquist EN, Pruller J, Nguyen TH et al. (2022): Interplay between mitochondrial reactive oxygen species, oxidative stress and hypoxic adaptation in facioscapulohumeral muscular dystrophy. Metabolic stress as potential therapeutic target. *Redox biology* 51: 102251.
- Hicks D, Sarkozy A, Muelas N, Köehler K, Huebner A, Hudson G et al. (2011): A founder mutation in Anoctamin 5 is a major cause of limb-girdle muscular dystrophy. *Brain : a journal of neurology* 134: 171–182
- Holm-Yildiz S, Witting N, De Stricker Borch J, Kass K, Khawajazada T, Krag T, Vissing J (2021): Muscle biopsy and MRI findings in ANO5-related myopathy. *Muscle & nerve* 64: 743–748
- Hurshman AR, White JT, Powers ET, Kelly JW (2004): Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization. *Biochemistry* 43: 7365–7381
- Ikezoe K, Furuya H, Ohyagi Y, Osoegawa M, Nishino I, Nonaka I, Kira JI (2003): Dysferlin expression in tubular aggregates. Their possible relationship to endoplasmic reticulum stress. *Acta neuropathologica* 105: 603–609
- Jaiswal JK, Marlow G, Summerill G, Mahjneh I, Mueller S, Hill M et al. (2007): Patients with a non-dysferlin Miyoshi myopathy have a novel membrane repair defect. *Traffic* 8: 77–88
- Javid B, MacAry PA, Lehner PJ (2007): Structure and function. Heat shock proteins and adaptive immunity. *Journal of immunology* 179: 2035–2040.
- Jucker M, Walker LC (2013): Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501: 45–51
- Khawajazada T, Kass K, Rudolf K, De Stricker Borch J, Sheikh AM, Witting N, Vissing J (2021): Muscle involvement assessed by quantitative magnetic resonance imaging in patients with anoctamin 5 deficiency. *European journal of neurology* 28: 3121–3132
- Kreuder J, Borkhardt A, Repp R, Pekrun A, Götsche B, Gottschalk U et al. (1996): Brief report. Inherited metabolic myopathy and hemolysis due to a mutation in aldolase A. *The New England journal of medicine* 334: 1100–1104
- Lee J, Culyba EK, Powers ET, Kelly JW (2011): Amyloid- $\beta$  forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. *Nature chemical biology* 7: 602–609
- Li C, Haller G, Weihl CC (2022) Current and Future Approaches to Classify VUSs in LGMD-Related Genes. *Genes* 13: 382
- Li J, Yin C, Okamoto H, Jaffe H, Oldfield EH, Zhuang Z et al. (2006): Proteomic analysis of inclusion body myositis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65: 826–833.
- Liewluck T, Milone M (2017): Characterization of isolated amyloid myopathy. *European journal of neurology* 24: 1437–1445
- Liewluck T, Winder TL, Dimberg EL, Crum BA, Heppelmann CJ, Wang Y et al. (2013): ANO5-muscular dystrophy. Clinical, pathological and molecular findings. *European journal of neurology* 20: 1383–1389
- Lindberg I, Shorter J, Wiseman RL, Chiti F, Dickey CA, McLean PJ (2015): Chaperones in Neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35: 13853–13859
- Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C et al. (1998): Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nature genetics* 20: 31–36

- Loreti M, Sacco A (2022): The jam session between muscle stem cells and the extracellular matrix in the tissue microenvironment. *NPJ Regenerative medicine* 7: 16
- Ma B, Zhang K, Hendrie C, Liang C, Li M, Doherty-Kirby A, Lajoie G (2003): PEAKS. Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry RCM* 17: 2337–2342
- Magri F, Del Bo R, D'Angelo MG, Sciacco M, Gandossini S, Govoni A et al. (2012): Frequency and characterisation of anoctamin 5 mutations in a cohort of Italian limb-girdle muscular dystrophy patients. *Neuromuscular disorders: NMD* 22: 934–943
- Mahjneh I, Jaiswal J, Lamminen A, Somer M, Marlow G, Kiuru-Enari S, Bashir R (2010): A new distal myopathy with mutation in anoctamin 5. *Neuromuscular disorders: NMD* 20: 791–795
- Mendell JR, Sahenk Z, Gales T, Paul L (1991): Amyloid filaments in inclusion body myositis. Novel findings provide insight into nature of filaments. *Archives of neurology* 48: 1229–1234
- Milone M, Liewluck T, Winder TL, Pianosi PT (2012): Amyloidosis and exercise intolerance in ANO5 muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders: NMD* 22:13–15
- Mizuta K, Tsutsumi S, Inoue H, Sakamoto Y, Miyatake K, Miyawaki K et al. (2007): Molecular characterization of GDD1/TMEM16E, the gene product responsible for autosomal dominant gnathodiaphyseal dysplasia. *Biochemical and biophysical research communications* 357: 126–132
- Murphy AP, Straub V (2015): The Classification, Natural History and Treatment of the Limb Girdle Muscular Dystrophies. *Journal of neuromuscular diseases* 2: 7-19
- Murphy S, Zwyer M, Henry M, Meleady P, Mundegar RR, Swandulla D, Ohlendieck K (2019): Proteomic analysis of the sarcolemma-enriched fraction from dystrophic mdx-4cv skeletal muscle. *Journal of proteomics* 191: 212–227
- Ohira T, Ino Y, Nakai Y, Morita H, Kimura A, Kurata Y et al. (2020): Proteomic analysis revealed different responses to hypergravity of soleus and extensor digitorum longus muscles in mice. *Journal of proteomics* 217: 103686
- Olzscha H, Schermann SM, Woerner AC, Pinkert S, Hecht MH, Tartaglia GG, Vendruscolo M, Hayer-Hartl M, Hartl FU, Vabulas RM (2011): Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell* 144: 67–78
- Papadopoulos C, Svingou M, Kekou K, Vergnaud S, Xirou S, Niotakis G, Papadimas GK (2021): Aldolase A deficiency. Report of new cases and literature review. *Molecular genetics and metabolism reports* 27: 100730
- Papadopoulos C, Laforêt P, Nectoux J, Stojkovic T, Wahbi K, Carlier RY et al. (2017): Hyperckemia and myalgia are common presentations of anoctamin-5-related myopathy in French patients. *Muscle & nerve* 56: 1096–1100
- Penttilä S, Palmio J, Suominen T, Raheem O, Evilä A, Muelas Gomez N et al. (2012): Eight new mutations and the expanding phenotype variability in muscular dystrophy caused by ANO5. *Neurology* 78: 897–903
- Phuong TTT, An J, Park SH, Kim A, Choi HB, Kang TM (2019): Deficiency of Anoctamin 5/TMEM16E causes nuclear positioning defect and impairs Ca<sup>2+</sup> signaling of differentiated C2C12 myotubes. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 23: 539–547

- Pines M, Levi O, Genin O, Lavy A, Angelini C, Allamand V, Halevy O (2017): Elevated Expression of Moesin in Muscular Dystrophies. *The American journal of pathology* 187: 654–664
- Qiang W, Yau WM, Lu JX, Collinge J, Tycko R (2017): Structural variation in amyloid- $\beta$  fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes. *Nature* 541: 217–221
- Sainio MT, Aaltio J, Hyttinen V, Kortelainen M, Ojanen S, Paetau A et al. (2022): Effectiveness of clinical exome sequencing in adult patients with difficult-to-diagnose neurological disorders. *Acta neurologica Scandinavica* 145: 63–72
- Sarkozy A, Deschauer M, Carlier RY, Schrank B, Seeger J, Walter MC et al. (2012): Muscle MRI findings in limb girdle muscular dystrophy type 2L. *Neuromuscular disorders: NMD* 22: 122-9
- Sarkozy A, Hicks D, Hudson J, Laval SH, Barresi R, Hilton-Jones D et al. (2013): ANO5 gene analysis in a large cohort of patients with anoctaminopathy. Confirmation of male prevalence and high occurrence of the common exon 5 gene mutation. *Human mutation* 34: 1111–1118
- Schneider I, Stoltenburg G, Deschauer M, Winterholler M, Hanisch F (2014): Limb girdle muscular dystrophy type 2L presenting as necrotizing myopathy. *Acta myologica: myopathies and cardiomyopathies: official journal of the Mediterranean Society of Myology* 33: 19–21.
- Schooser B, Laforêt P, Kruijshaar ME, Toscano A, van Doorn PA, van der Ploeg AT (2015): 208th ENMC International Workshop. Formation of a European Network to develop a European data sharing model and treatment guidelines for Pompe disease Naarden, The Netherlands, 26-28 September 2014. *Neuromuscular disorders: NMD* 25: 674–678
- Seguí F, Gonzalez-Quereda L, Sanchez A, Matas-García A, Garrabou G, Rodriguez MJ et al. (2020): Anoctamin 5 (ANO5) muscular dystrophy-three different phenotypes and a new histological pattern. *Neurological sciences: official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 41: 2967–2971
- Seidler DG, Faiyaz-UI-Haque M, Hansen U, Yip GW, Zaidi SH, Teebi AS et al. (2006): Defective glycosylation of decorin and biglycan, altered collagen structure, and abnormal phenotype of the skin fibroblasts of an Ehlers-Danlos syndrome patient carrying the novel Arg270Cys substitution in galactosyltransferase I (beta4GalT-7). *Journal of molecular medicine* 84: 583–594.
- Silva AMS, Coimbra-Neto AR, Souza PVS, Winckler PB, Gonçalves MVM, Cavalcanti EBU et al. (2019): Clinical and molecular findings in a cohort of ANO5-related myopathy. *Annals of clinical and translational neurology* 6: 1225–1238.
- Spuler S, Carl M, Zabojszcza J, Straub V, Bushby K, Moore SA et al. (2008): Dysferlin-deficient muscular dystrophy features amyloidosis. *Annals of neurology* 63: 323–328
- Spuler S, Emslie-Smith A, Engel AG (1998): Amyloid myopathy. An underdiagnosed entity. *Annals of neurology* 43: 719–728
- Straub V, Murphy A, Udd B (2018): 229th ENMC international workshop. Limb girdle muscular dystrophies - Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17-19 March 2017. *Neuromuscular disorder: NMD* 28: 702–710
- Suzuki J, Denning DP, Imanishi E, Horvitz HR, Nagata S (2013): Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science* 341: 403–406

- Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S (2010): Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 468: 834–838
- Terrill JR, Radley-Crabb HG, Iwasaki T, Lemckert FA, Arthur PG, Grounds MD (2013): Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies. Focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *The FEBS journal* 280: 4149–4164
- Thompson R, Straub V (2016): Limb-girdle muscular dystrophies - international collaborations for translational research. *Nature reviews. Neurology* 12: 294–309
- Tidball JG, Welc SS, Wehling-Henricks M (2018): Immunobiology of Inherited Muscular Dystrophies. *Comprehensive Physiology* 8: 1313–1356
- Udd B (2014): Distal myopathies. *Current Neurology and Neuroscience Report* 14: 434
- Ueda M, Horibata Y, Shono M, Misumi Y, Oshima T, Su Y et al. (2011): Clinicopathological features of senile systemic amyloidosis. An ante- and post-mortem study. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24: 1533–1544
- Urao N, Mirza RE, Heydemann A, Garcia J, Koh TJ (2016): Thrombospondin-1 levels correlate with macrophage activity and disease progression in dysferlin deficient mice. *Neuromuscular disorders: NMD* 26: 240–251
- Vázquez J, Lefeuvre C, Escobar RE, Luna Angulo AB, Miranda Duarte A, Delia Hernandez A et al. (2020): Phenotypic Spectrum of Myopathies with Recessive Anoctamin-5 Mutations. *Journal of neuromuscular diseases* 7: 443–451
- Vissing J, Dahlqvist JR, Roudaut C, Poupiot J, Richard I, Duno M, Krag T (2020): A single c.1715GC calpain 3 gene variant causes dominant calpainopathy with loss of calpain 3 expression and activity. *Human mutation* 41: 1507–1513
- Wahbi K, Béhin A, Bécane HM, Leturcq F, Cossée M, Laforêt P et al. (2013): Dilated cardiomyopathy in patients with mutations in anoctamin 5. *International journal of cardiology* 168: 76–79
- Walton JN, Nattrass FJ (1954): On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain: a journal of neurology* 77: 169–231
- Warman Chardon J, Díaz-Manera J, Tasca G, Bönnemann CG, Gómez-Andrés D, Heerschap A et al. (2019): MYO-MRI diagnostic protocols in genetic myopathies. *Neuromuscular disorders: NMD* 29: 827–841
- Watt B, van Niel G, Raposo G, Marks MS (2013): PMEL. A pigment cell-specific model for functional amyloid formation. *Pigment cell & melanoma research* 26: 300–315
- Westermarck P, Andersson A, Westermarck GT (2011): Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiological reviews* 91: 795–826
- Whitlock JM, Yu K, Cui YY, Hartzell HC (2018): Anoctamin 5/TMEM16E facilitates muscle precursor cell fusion. *The Journal of general physiology* 150: 1498–1509
- Xu J, El Refaey M, Xu L, Zhao L, Gao Y, Floyd K et al. (2015): Genetic disruption of Ano5 in mice does not recapitulate human ANO5-deficient muscular dystrophy. *Skeletal muscle* 5: 43.
- Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS et al. (2008): TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455: 1210–1215
- Yu K, Whitlock JM, Lee K, Ortlund EA, Cui YY, Hartzell HC (2015): Identification of a lipid scrambling domain in ANO6/TMEM16F. *eLife* 4: e06901

## 8 Thesen

1. Anoctamin 5 nimmt möglicherweise eine Doppelrolle sowohl in der Membranreparatur als auch in der Calciumhomöostase ein, wie dies schon bereits in vorherigen Arbeiten vermutet wurde. (Whitlock et al. 2018, Chandra et al. 2019)
2. Eine Mutation im Anoctamin-5-Gen und ein damit verbundener loss-off-function von Anoctamin 5 führt zu sekundären Veränderungen in der Zelle, wie beispielsweise im Energiestoffwechsel. Hier besteht möglicherweise auch eine Analogie zur Muskeldystrophie Duchenne.
3. Im Rahmen der Calciumhomöostase besteht eine Synergie zwischen der SERCA und Anoctamin 5. Auch hier besteht eine Analogie zur Duchenne Muskeldystrophie.
4. Obwohl in der Hallenser Kohorte keine Herzbeteiligung nachgewiesen wurde, kann die in kleineren Fallberichten beschriebene Herzbeteiligung möglicherweise auf das Fehlen von high-energy Phosphaten durch die Störungen in der Atmungskette zurückgeführt werden.
5. Die verminderte Expression von Transthyretin bei Patienten mit Mitochondriopathie gibt einen Hinweis auf eine möglicherweise sekundär entstehende entzündliche Komponente.
6. Da die Amyloidablagerungen ungleichmäßig in der Muskulatur der Patienten verteilt sind, ist es nicht auszuschließen, dass alle ANO5-Patienten davon betroffen sind und die Ablagerungen lediglich durch einen „sampling error“ nicht erfasst wurden.

## **Anlagen**

### **Lebenslauf**

Richert, Caroline

### **Schulbildung**

Ratsgymnasium Wolfsburg

Allgemeine Hochschulreife 20.06.2011

### **Hochschulausbildung**

WiSe 2011/12 – SoSe 2018

Studium Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

09/2013

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/2017

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

05/2018

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Praktisches Jahr**

05/2017 – 04/2018

Klinik und Poliklinik für Neurologie UK Halle,  
Universitätsspital Zürich – Klinik für Innere  
Medizin, Abteilung für Unfallchirurgie/Klinik  
für Viszeralchirurgie des  
Universitätsklinikum Halle

### **Berufliche Tätigkeit**

08/2018 – 04/2020

Assistenzärztin Neurologie Klinik und  
Poliklinik für Neurologie UK Halle

05/2020 – 01/2021

Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dölau –  
Klinik für Innere Medizin I

Seit 02/2021

Assistenzärztin Arbeitsmedizin in Erfurt

## **Erklärungen**

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum, Unterschrift

## **Danksagung**

Zu Beginn danke ich Herrn Prof. Dr. Zierz, der es mir ermöglicht hat im Muskellabor der Klinik für Neurologie des Uniklinikums Halle/Saale diese Dissertation erstellen zu können und mir mit seiner fachlichen Expertise wieder einmal ein geschätzter Lehrer und Betreuer war.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. Ilka Schneider, die mich durchweg mit ihrer unglaublich geduldigen Art bei der Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten unterstützt hat.

Mein Dank gilt darüber hinaus Frau Prof. Dr. Gisela Stoltenburg-Didinger vom Institut für Zell- und Neurobiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin für die Einarbeitung in die Beurteilung der Myopathologie. Des Weiteren Danke ich Herrn Dr. Oliver Klein und seinem Team vom BIH Center for Regenerative Therapies der Charité Universitätsmedizin Berlin, ohne die die Durchführung der Proteomics-Analyse nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter, meinem Bruder, meinem Freund und meinen beiden engsten Freundinnen. Ohne eure emotionale Unterstützung hätte ich diese anstrengende Zeit nicht durchgehalten und ich bin dankbar, dass ihr mit mir alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit durchgestanden habt.