

Eine Korrelationsanalyse von Myopathologie, Phäno- und Genotyp bei  
Patienten mit Morbus Pompe im Erwachsenenalter (LOPD)

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kulesa, Martin  
aus Berlin

Gießen 2020

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Institut für Neuropathologie

Gutachter: Prof. Dr. Till Acker

Gutachterin: Prof. Dr. Heidrun Krämer-Best

Tag der Disputation: 24.02.2021

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Glykogenspeichererkrankungen</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Lysosomale Speichererkrankungen</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Morbus Pompe (Glykogenose Typ II)</b> .....	<b>3</b>
1.3.1 Pathogenese - Morbus Pompe.....	3
1.3.2 Historie – Morbus Pompe .....	3
1.3.3 Inzidenz – Morbus Pompe .....	4
1.3.4 Klinische Phänotypen - Morbus Pompe .....	4
1.3.5 Genetik – Morbus Pompe .....	6
1.3.6 Die Rolle der Autophagie bei Morbus Pompe .....	7
1.3.7 Diagnostik – Morbus Pompe .....	9
1.3.8 Therapie – Morbus Pompe.....	16
<b>2 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>20</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Studienkohorte</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 Klinische Befunde der LOPD Patienten</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3 Analyse der Muskelpathologie</b> .....	<b>29</b>
3.3.1 Anfertigung der Gewebeschnitte .....	29
3.3.2 Quantifizierung der Muskelpathologie .....	30
3.3.3 Quantitative Analyse der Glykogenakkumulation und large empty vacuoles (LEV) der Muskelfasern pro Fläche mittels Kreuzraster .....	31
3.3.4 Ermittlung des Muskelscores .....	32
3.3.5 Semiquantitative Analyse des Fibrosegrades des Muskelgewebes .....	35
3.3.6 Quantitative Analyse der autophagischen Vakuolen .....	36
<b>3.4 Angaben zur Statistik</b> .....	<b>37</b>
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1 Darstellung der Studienkohorte</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2 Quantifizierung der Muskelpathologie</b> .....	<b>39</b>

4.2.1 Muskelscore, Glykogenakkumulation, large empty vacuoles, autophagische Vakuolen und Fibrose .....	39
4.2.2 Muskelscore und Glykogenakkumulation bei Patienten mit LOPD im Vergleich zu Kontrollfällen .....	42
4.2.3 Analyse der Vakuolen (LEV%/MF, AV%/MF) .....	45
4.2.4 Muskelscore, Glykogenakkumulation und large empty vacuoles unter Berücksichtigung der autophagischen Vakuolen.....	46
4.2.5 Korrelationsanalyse des Muskelscores unter Berücksichtigung weiterer morphologischer Parameter .....	48
<b>4.3 Fallbeispiele .....</b>	<b>51</b>
<b>4.4 Korrelation der Muskelpathologie mit klinischen Parametern.....</b>	<b>54</b>
4.4.1 Muskelscore und Glykogenakkumulation unter Berücksichtigung des Alters der Patienten bei Biopsie .....	54
4.4.2 Muskelscore, Glykogenakkumulation und large empty vacuoles unter Berücksichtigung des Alters bei Symptombeginn .....	55
4.4.3 Muskelscore, Glykogenakkumulation und large empty vacuoles unter Berücksichtigung der Krankheitsdauer.....	56
4.4.4 Muskelscore und Glykogenakkumulation unter Berücksichtigung der Restenzymaktivität.....	59
4.4.5 Muskelscore, Glykogenakkumulation und large empty vacuoles unter Berücksichtigung der Creatinkinase .....	60
4.4.6 Korrelation der autophagischen Vakuolen und large empty vacuoles mit dem klinischen Phänotyp .....	62
<b>4.5 Genetik - Korrelationsanalyse des myopathologischen Phänotyps mit dem Genotyp der LOPD Patienten.....</b>	<b>65</b>
4.5.1 Genetik der Studienkohorte .....	65
4.5.2 Analyse des Genotyps anhand morphologischer und klinischer Parameter ..	69
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>74</b>
<b>5.1 Studiendesign.....</b>	<b>76</b>
<b>5.2 Muskelpathologie bei LOPD Patienten.....</b>	<b>77</b>
5.2.1 Autophagische Prozesse im Skelettmuskel bei LOPD Patienten .....	79
<b>5.3 Korrelation Muskelpathologie - klinischer Phänotyp bei LOPD Patienten..</b>	<b>81</b>

5.4 Korrelation Muskelpathologie - Genotyp bei LOPD Patienten .....	82
5.5 Bewertung eigener Studienergebnisse.....	84
6 Zusammenfassung.....	85
7 Summary.....	86
8 Abkürzungsverzeichnis .....	87
9 Literaturverzeichnis .....	89
10 Publikationsverzeichnis.....	95
11 Anhang.....	96
11.1 Arbeitsplan zur Gewebeerstellung.....	96
11.2 Gewebefixation.....	96
11.3 Resin-Gewebeeinbettung (100 Agar Resin Kit) .....	97
11.4 PAS-Färbung für Semidünnschnitte (1.5 µm) .....	97
11.5 PPD- Färbung für Semidünnschnitte (1.5 µm) .....	98
11.6 Richardson-Färbung für Muskel und Nerven .....	98
11.7 Geräte- und Substanzliste .....	99
12 Poster.....	100
13 Publikation.....	101
14 Danksagung .....	117
15 Erklärung zur Dissertation .....	118

# 1 Einleitung

## 1.1 Glykogenspeichererkrankungen

Glykogenspeichererkrankungen bilden eine Gruppe von genetisch bedingten Erkrankungen, die aufgrund eines Enzymdefektes Einfluss auf den Glykogenmetabolismus in den menschlichen Körperzellen haben (Chen 2016).

Bisher sind 9 unterschiedliche Glykogenosen beschrieben worden, denen ein unterschiedlicher Enzymdefekt zu Grunde liegt (Tabelle 1). Die Erkrankungen unterscheiden sich unter anderem in der Lokalisation der betroffenen Organe, ihrem Krankheitsverlauf und der Therapie.

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten werden der Glykogenose Typ II (Morbus Pompe) zugeordnet. Bei Morbus Pompe liegt pathogenetisch ein Mangel des lysosomalen Enzyms „saure Maltase“ ( $\alpha$ -1,4-Glucosidase) zugrunde (Hers 1963). Dies führt in seinem Verlauf zu einer Myopathie mit bei Krankheitsbeginn vor allem pathologischer intralysosomaler Glykogenablagerung (Hirschhorn 2001).

Aktuell werden zwei Ausprägungsformen des Morbus Pompe unterschieden, die sich nach dem Erkrankungsalter der Patienten richten: Infantile Patienten, die bereits von Geburt an Symptomenausprägungen bzw. in frühester Kindheit klinische Manifestationen zeigen (infantile onset Pompe disease; IOPD) sowie juvenile bzw. adulte Patienten (late onset Pompe disease; LOPD), die teilweise in späten Lebensdekaden erstmals Symptome der Erkrankung aufweisen (Montagnese, Barca et al. 2015). Insbesondere bei den infantilen Patienten ist ein schwerer klinischer Verlauf bekannt (Prater, Banugaria et al. 2012).

**Tabelle 1: Übersichtsdarstellung der bekannten Glykogenspeicherkrankheiten; Typ II der Glykogenosen wird nach seinem Erstbeschreiber auch Morbus Pompe genannt (Hoffmann 2013).**

Typ	Enzymdefekt	Speicherorgan
Ia	Glukose-6-Phosphatase	Leber, Niere
I non-a	Glukose-6-Phosphat- sowie Phosphattranslokase	Leber
II	<b>lysosomale <math>\alpha</math>-Glucosidase</b>	<b>generalisiert</b>
III	Amylo-1,6-Glucosidase	Leber, Muskel, Erythrozyten
IV	Brancher-Enzym	Leber
V	Phosphorylase	Muskel
VI	Phosphorylase/Phosphorylase-b-Kinase	Leber, Muskel, Erythrozyten
VII	Phosphofruktokinase	Muskel, Erythrozyten
0	Glykogensynthetase	keine Speicherung

## 1.2 Lysosomale Speichererkrankungen

Die Erkrankung Morbus Pompe zählt als Glykogenose ebenfalls zu den über 40 bekannten lysosomalen Speichererkrankungen, die je nach Ursache in verschiedene Untergruppen klassifiziert werden (Tabelle 2). Lysosomale Speichererkrankungen zeichnen sich als genetisch bedingte Erkrankungen durch eine lysosomale Enzymdefizienz aus. In den Körperzellen führt dies im jeweiligen Krankheitsverlauf zu einem gestörten Metabolismus der betroffenen Stoffwechselprodukte und einer vermehrten Anhäufung dieser Metabolite, die bei gesunden Menschen durch eine regelhafte Enzymaktivität abgebaut werden würden (Ferreira and Gahl 2017). Die klinischen Manifestationen der lysosomalen Speichererkrankungen ähneln sich in bestimmten Charakteristika. Viele Erkrankungen dieser Gruppe verursachen Knochendeformitäten, Organvergrößerungen sowie Veränderungen des zentralen und peripheren Nervensystems. Allen Krankheiten ist gemein, dass sie einen schweren Verlauf und mitunter frühen Tod der Patienten zur Folge haben (Mehta et al. 2006).

**Tabelle 2: Klassifizierung lysosomaler Speichererkrankungen. Morbus Pompe gehört zu den Glykogenosen (Mehta et al. 2006).**

<b>Lysosomale Speichererkrankungen</b>
Mukopolysaccharidosen
Oligosaccharidosen
Mukolipidosen
Sphingolipidosen
Lipidspeichererkrankungen
<b>Lysosomale Glykogenspeicherung</b>
Lysosomale Transportstörungen

## **1.3 Morbus Pompe (Glykogenose Typ II)**

### **1.3.1 Pathogenese - Morbus Pompe**

Patienten mit Morbus Pompe leiden unter einer compound heterozygot vererbten Erkrankung, die sich in einem lysosomalen Enzymdefekt (saure alpha-1,4-Glukosidase) auf dem Chromosom 17q25 im GAA-Gen (alpha-glucosidase alpha) manifestiert (Hirschhorn 2001). Bis heute sind über 350 verschiedene Mutationen im GAA-Gen bekannt. Bei gesunden Menschen wandelt die aktivierte alpha-1,4-Glukosidase im sauren Milieu der Lysosomen gespeichertes Glykogen in Glucose um (Muller-Felber, Horvath et al. 2007). Der Enzymdefekt führt bei Morbus Pompe Patienten zu einem gestörten Metabolismus des Glykogens in den Lysosomen der Muskelzellen und es kommt zu einer pathologischen Glykogenakkumulation (Hirschhorn 2001). In Studien konnte gezeigt werden, dass die pathologische Glykogenakkumulation nicht nur auf die Skelettmuskulatur der Patienten beschränkt ist. Glykogenablagerungen wurden nicht zuletzt in postmortalen Untersuchungen auch in der glatten Muskulatur der Hohlorgane (Ösophagus, Magen, Dün-, Dickdarm, Harntrakt, Gefäße), im Herzmuskel, im zentralen Nervensystem (ZNS) und in den Augenpartien (Muskulatur, Cornea, Linse) der Patienten gefunden (Hobson-Webb, Proia et al. 2012; Pena, Proia et al. 2015; Schänzer, Görlach et al. 2019). Die heterogene klinische Symptomatik korreliert mit diesen Befunden.

### **1.3.2 Historie – Morbus Pompe**

Schon in den 1930er Jahren beschäftigten sich Wissenschaftler aus den Niederlanden mit dem Thema der Muskelhypertrophie im Herzmuskel und erwähnten in ihren Berichten Morbus Pompe, eine Erkrankung, die nach dem gleichnamigen Pathologen Johannes Cassanius Pompe benannt ist. Dieser beschrieb im Jahre 1932 erstmalig eine Hypertrophie des Herzens aufgrund einer übermäßigen Glykogenakkumulation und lieferte damit eine Erklärung für bis dahin unter dem Begriff der idiopathischen Herzhypertrophie abgehandelte Fallberichte (van Creveld and van der Linde 1939). Ein Mangel an Glucose-6-Phosphatase, bzw. Amylo-1,6-Glukosidase war damals für das Auslösen von Glykogenspeichererkrankungen bekannt. Beim Morbus Pompe stellte sich die Situation jedoch anders dar: Bei der in dieser Zeit beobachteten schwersten Form der Glykogenakkumulation in den Körperzellen, bei denen Patienten unter einer starken Kardiomegalie litten und in der Regel vor dem 2. Lebensjahr verstarben, zeigten sich

diese biochemisch bestimmten Enzyme normwertig. Erst im Jahre 1963 gelang der biochemische Nachweis, dass bei Patienten mit Morbus Pompe (Glykogenose Typ II) im Vergleich zu gesunden Menschen das Enzym der sauren Maltase (alpha-1,4-Glucosidase) im Gewebe nicht nachweisbar war (Hers 1963). Die Ergebnisse belegten, dass diese Glykogenose durch eine vorher unbekannte lysosomale Enzymdefizienz ausgelöst wird.

### **1.3.3 Inzidenz – Morbus Pompe**

Bei Morbus Pompe ist die Inzidenz in den einzelnen Ländern bzw. auf den einzelnen Kontinenten unterschiedlich und abhängig von der ethnischen Herkunft. In China liegt die Inzidenz bei ca. 1/50.000, in den Niederlanden bei ca. 1/40.000 und in Australien dagegen nur bei 1/146.000 (van der Ploeg and Reuser 2008). Das neonatale Screening Programm mittels Trockenbluttest deckte in Taiwan und Österreich eine höhere Krankheitsinzidenz von 1/40.000 auf, als bisher in diesen Populationen angenommen wurde (Lim, Li and Raben 2014). In Deutschland wird die Inzidenz des late onset Pompe disease (LOPD) mit 1/100.000-130.000 beziffert (Schuller, Kornblum et al. 2013).

### **1.3.4 Klinische Phänotypen**

Morbus Pompe ist ursprünglich als infantile onset Pompe disease (IOPD) bekannt gewesen, bei der Kinder schon einen frühen Tod innerhalb der ersten Lebensjahre erwarten mussten (Engel, Gomez et al. 1973). In den letzten Jahrzehnten ist jedoch eine wachsende Zahl von adulten Patienten beschrieben worden, die erst in späteren Lebensdekaden klinische Symptome dieser Erkrankung zeigten und zum Beispiel aufgrund einer isolierten Creatinkinase (CK)-Erhöhung oder einer progressiv verlaufenden körperstammnahen Muskelschwäche klinisch auffällig wurden (Muller-Felber, Horvath et al. 2007; Toscano and Schoser 2013). Nach aktuellem Stand werden zwei klinische Manifestationen unterschieden (Abb. 1).

#### **1.3.4.1 Infantiler Phänotyp (Infantile onset Pompe disease (IOPD))**

Ein infantiler Phänotyp liegt bei Säuglingen vor, die im frühen Neonatalalter (<12 Monaten) durch Herz-, Zungen- bzw. Lebervergrößerung auffallen. Typisch sind eine generelle Muskelschwäche (Hypotonie) sowie eine hypertrophe Kardiomyopathie. Die Kinder sterben ohne Therapie in der Regel vor dem 2. Lebensjahr an einem kardiopulmonalen Organversagen (Engel, Gomez et al. 1973; Hahn, Praetorius et al. 2015) (Abb.1). Laborchemisch lassen sich bei diesen Patienten vor allem erhöhte Transaminasen, eine HyperCKämie und eine Erhöhung der Lactatdehydrogenase (LDH) dokumentieren (Vill, Schessl et al. 2015). Die Patienten zeigen meist einen homozygoten Mutationsstatus im GAA-Gen sowie einen fast vollständigen Verlust der Enzymaktivität der alpha-Glucosidase (Al-Hassnan, Khalifa et al. 2018).

#### **1.3.4.2 Adulter Phänotyp (Late onset Pompe disease (LOPD))**

Morbus Pompe Patienten vom adulten Phänotyp weisen meist erst im Erwachsenenalter Symptome auf (late onset Pompe disease). Das Auftreten der Symptome ist sehr heterogen und sie werden teilweise erstmalig in der 6. Lebensdekade manifest (Hirschhorn 2001). In ca. 90 % der Fälle zeigen adulte Morbus Pompe Patienten als erstes Symptom eine proximal betonte Muskelschwäche. Diese bezieht sich vordergründig auf die Muskulatur des Beckens sowie des Rumpfgürtels (Schuller, Kornblum et al. 2013). In der klinischen Untersuchung imponieren häufig auch Auffälligkeiten der axialen Muskulatur (Scapula alata, Hyperlordose, Skoliose) und bei Befall der Atemmuskulatur Symptome einer schweren ventilatorischen Insuffizienz (van der Ploeg, Carlier et al. 2016). Seltener sind jedoch auch Anomalien in der Struktur der Herzleitungsorgane beschrieben (Lee, Qiu et al. 2014; Crescimanno, Modica et al. 2015) (Abb. 1).

Eine im Jahr 2005 durchgeführte Studie von Hagemans zeigte, dass von 54 untersuchten niederländischen adulten Morbus Pompe Patienten 48 % auf den Rollstuhl angewiesen waren und 37 % eine künstliche Beatmung benötigten. Über 60 % der Patienten hatten Probleme beim Treppensteigen, dem Aufrichten nach vorherigem Vorneüberbeugen sowie dem Aufstehen aus dem Sessel. 67 % litten unter Ermüdungserscheinungen und knapp die Hälfte der Patienten verspürte insbesondere in der Muskulatur der Extremitäten chronische Schmerzen. Unter den LOPD Patienten gaben über die Hälfte der Patienten

retrospektiv an, schon in der Jugend milde muskuläre Symptome gehabt zu haben (Hagemans, Winkel et al. 2005; Crescimanno, Modica et al. 2015).

<b>LOPD</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- schwere Hypotonie</li> <li>- Kardiomegalie</li> <li>- Ohne Therapie Tod innerhalb der ersten beiden Lebensjahre durch kardiopulmonales Organversagen</li> </ul>
<b>LOPD</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Progressiv verlaufende Muskelschwäche</li> <li>- Betonung der proximalen Extremitäten und der axialen Rumpfmuskulatur</li> <li>- häufig Zeichen von diaphragmaler Schwäche mit ventilatorischer Insuffizienz</li> </ul>

**Abbildung 1: Klinische Phänotypen des Morbus Pompe**

### 1.3.5 Genetik – Morbus Pompe

Die Erkrankung des Morbus Pompe basiert auf pathologischen Sequenzveränderungen im GAA-Gen auf Chromosom 17q25, welches 19 Exone beinhaltet, die für verschiedene Aminosäuren codieren. Damit sich die Krankheit in einer reduzierten bzw. fehlenden Enzymaktivität manifestiert, ist eine pathologische Veränderung in beiden Kopien des GAA-Gen Voraussetzung (Kroos, Hoogeveen-Westerveld et al. 2012). Es ist bekannt, dass infantile Morbus Patienten einen fast kompletten Verlust der Restenzymaktivität aufweisen. Bei LOPD Patienten kann die residuale Enzymaktivität der alpha-Glucosidase allerdings bis zu 40 % betragen (Schuller, Kornblum et al. 2013). Unter den bekannten über 350 Mutationen im GAA-Gen zeigt sich eine große Heterogenität. Es sind Splice Site Mutationen, Missense Mutationen und Nonsense Mutationen beschrieben (Hirschhorn 2001). Teilweise gelingt eine Zuordnung zu ethnischen Gruppierungen, welche sich an der unterschiedlichen Inzidenz der Erkrankung weltweit ablesen lässt (Schuller et al. 2013). Die bei adulten Patienten bekannteste Mutation c.-32-13G>A ist als Splice Site Mutation im GAA-Gen bei ca. 90 % der Patienten auf mindestens einem Allel nachweisbar (Schuller et al. 2013). Bei infantilen Patienten konnte das Auftreten dieser Mutation in der Mehrzahl bei Jungen nachgewiesen worden (van Capelle, van der Meijden et al. 2016).

Morbus Pompe Patienten mit identischen Mutationen im GAA-Gen zeigen mitunter einen unterschiedlichen klinischen Phänotyp. In den letzten Jahren durchgeführte Studien

untersuchten Familien mit mindestens zwei an Morbus Pompe (IOPD sowie LOPD) erkrankten Geschwistern, die den gleichen Genotyp aufwiesen. Es zeigten sich teilweise Unterschiede in Verlauf und Schwere der Erkrankung, sodass neben den typischen Mutationen im GAA-Gen andere Faktoren, die Einfluss auf die klinische Manifestation sowie den Krankheitsverlauf haben, vermutet werden (Wens, van Gelder et al. 2013; Schänzer, Giese et al. 2017). Eine Studie aus dem Jahr 2015 analysierte 30 adulte Morbus Pompe Patienten (LOPD) hinsichtlich ihres Genotyps und klinischen Phänotyps. Hierbei bestätigte sich die klinische Heterogenität der Symptome bei zugleich zahlreichen Variationen der zugrunde liegenden Mutationen. Eine strikte Korrelation zwischen Genotyp und klinischem Phänotyp konnte nicht hergestellt werden (Montagnese, Barca et al. 2015). Seit dem Jahre 2004 werden in der Rotterdamer Datenbank ([www.pompecenter.nl](http://www.pompecenter.nl)) Daten über das Verhältnis von Genotyp und klinischem Phänotyp aufgezeichnet, um ein besseres Krankheitsverständnis und mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zu dokumentieren. Zum Zeitpunkt des zehnjährigen Bestehens im Jahre 2014 waren ca. 1300 Morbus Pompe Patienten aus 34 Ländern registriert (Kishnania, Chien et al. 2015).

### **1.3.6 Die Rolle der Autophagie bei Morbus Pompe**

Neben einer pathologischen Anhäufung von vor allem intralysosomalem Glykogen und einer nachfolgenden Ruptur der Lysosomen kommt es bei Morbus Pompe Patienten im Rahmen des Enzymdefektes zu gestörten Abläufen der Zellautophagie (Schuller, Kornblum et al. 2013). Die Autophagie stellt sich normalerweise in jeder Zelle als mehrstufiger dynamischer Zyklus dar. Die Folge der bei Morbus Pompe Patienten veränderten Stoffwechselprozesse sind eine zelluläre Dysfunktion und das Auftreten von irreversiblen Strukturschäden an betroffenen Geweben (Schuller, Kornblum et al. 2013). Verantwortlich dafür sind die gestörte Autophagosomen-Lysosomen Fusion und in der Folge die massive Anhäufung von autophagischem Material in den Myofibrillen (Raben, Hill et al. 2008). Es sind in diesem Zusammenhang bei infantilen sowie adulten Pompe Patienten unter anderem vacuoläre Einschlüsse von Lipofuszin entdeckt worden, die gemeinhin für einen Zellalterungsprozess bekannt sind (Feeney, Austin et al. 2014). Neben den vacuolären Lipofuszinablagerungen zeigen sich bei den Morbus Pompe Patienten deutliche Lysosomenerweiterungen sowie eine Anhäufung doppelmembrantragender Autophagosomen einschließlich unverdaulichem zytosolischem

Material. Bestimmte Markerproteine wie *P62*, *LC-3* oder *LAMP-1* lassen sich zur Detektion einer vorliegenden Störung des Autophagieprozesses bei Morbus Pompe Patienten nutzen (Lim, Li et al. 2014). Die Anhäufung von Proteinaggregaten und Autophagiesubstraten (z.B. des *SQSTM1*-Proteins) korrelierte in Studien mit der Faseratrophie und einer Zunahme der Muskelpathologie (Nascimbeni, Fanin et al. 2015). Dass es Zusammenhänge und Interaktionen zwischen dem Glykogenmetabolismus und dem Autophagie-Lysosomen-System gibt, ist ebenfalls in Studien belegt worden (Zirin, Nieuwenhuis et al. 2013) und bietet für die Zukunft Ansatzpunkte für weitere Therapiestrategien. Klinisch relevant ist das Thema der Autophagie unter Betrachtung der vorhandenen Enzyersatztherapie (ERT), die vor allem über den Transportweg der Endozytose einer fortschreitenden Glykogenakkumulation in den Lysosomen entgegenwirken soll. Vorhandene Zellbezirke mit gestörter Autophagie samt Glykogenakkumulation in autophagischen Vakuolen persistieren jedoch häufig unter Therapie, sodass das beste „Ansprechen“ auf die Therapie bisher bei Morbus Pompe Patienten mit allenfalls geringen autophagischen Veränderungen dokumentiert ist (Fukuda, Ewan et al. 2006). Es gibt Hinweise, dass eine frühzeitig begonnene Enzyersatztherapie (ERT) vor einem weiteren schweren Krankheitsverlauf und fortschreitender Muskelatrophie schützen kann, da unter anderem der autophagische Kreislauf noch nicht erheblich gestört sein könnte. Ist der Autophagieprozess jedoch bereits stark beeinflusst, kommt es unter anderem durch Hochregulation von Induktionsproteinen zur progredienten Muskelatrophie und Muskelschwäche (Nascimbeni, Fanin et al. 2012). Eine Studie aus dem Jahr 2017 bestätigte diesen Ansatz, indem sie zeigte, dass bei infantilen Morbus Pompe Patienten das klinische Ansprechen auf die Enzyersatztherapie (ERT) bei den Patienten besser war, bei denen die Muskelpathologie nur wenige Vakuolen sowie eine allenfalls diskret gestörte Autophagie aufwies (Schänzer, Kaiser et al. 2017).

Es gibt Hinweise, dass die Inaktivierung spezieller an dem Prozess der Autophagie beteiligter Gene (z.B. *Atg7*) den Effekt einer folgenden Enzyersatztherapie (ERT) im Muskelgewebe positiv beeinflussen kann und zu einer signifikanten Reduktion der pathologischen Glykogenakkumulation führt (Raben, Schreiner et al. 2010; Malicdan and Nishino 2012). Auch für den *mTOR* (mechanistic target of rapamycin) Signalweg gibt es Anzeichen, dass bei Morbus Pompe Patienten Signaldefekte vorliegen (Lim, Li et al. 2017). *mTOR* gilt unter anderem als wichtiger Wachstumsregulator für die zelluläre Homöostase und begrenzt katabole Zellprozesse wie die Autophagie (Laplane and

Sabatini 2012). Bei Ausschaltung vorliegender Signaldefekte zeigten Studien eine Reaktivierung des *mTOR* Komplexes und einen signifikanten Rückgang der autophagischen Veränderungen (Lim, Li et al. 2017).

### **1.3.7 Diagnostik – Morbus Pompe**

In vielen Fällen ist die Diagnosestellung eines Morbus Pompe verzögert (Gutierrez-Rivas, Bautista et al. 2015). Die ausgeprägte klinische Heterogenität erschwert insbesondere die Diagnostik bei adulten Morbus Pompe Patienten (LOPD). Primär zeigen diese Patienten eine Myopathie vom Gliedergürteltyp. In der klinischen Untersuchung ist dementsprechend häufig eine proximal betonte Muskelschwäche der Becken- und Rumpfmuskulatur zu finden (Schuller, Kornblum et al. 2013). Eine Studie dokumentierte an 17 LOPD Patienten eine mittlere Zeitspanne zwischen dem Auftreten erster Symptome und der Diagnosestellung von 5 Jahren (Musumeci, la Marca et al. 2016).

#### **1.3.7.1 Enzymaktivitätsmessung**

Die Diagnose eines Morbus Pompe kann anhand einer reduzierten bzw. fehlenden Enzymaktivität der alpha-1,4-Glucosidase gestellt werden. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt in der Regel durch einen nichtinvasiven Trockenbluttest (DBS), welcher in der Praxis ein sehr zuverlässiges sowie sensitives Messinstrument darstellt (Gutierrez-Rivas, Bautista et al. 2015). Liefert ein erster Test pathologisch niedrige (GAA-Aktivität < 50 % in Leukozyten) Enzymaktivitätswerte wird der Test ein zweites Mal durchgeführt, um das Ergebnis zu bestätigen (Schuller, Kornblum et al. 2013). Auch an kultivierten Fibroblasten oder an einer Muskelbiopsie, bzw. an gereinigten Lymphozyten lässt sich die Enzymaktivitätsmessung durchführen. Ebenso ist im Rahmen der Pränatal-Diagnostik eine Enzymaktivitätsmessung in Amnionzellen möglich (Hirschhorn 2001). Bei klinischem Verdacht eines Morbus Pompe ist die Durchführung eines Trockenbluttests (DBS) empfohlen und eine invasive Muskelbiopsie meist nicht mehr notwendig (Vissing, Lukacs et al. 2013). Eine Untersuchung der GAA-Enzymaktivität ist bisher in Deutschland kein Bestandteil des Neugeborenencreening ([www.awmf.org](http://www.awmf.org)).

### **1.3.7.2 Genetische Diagnostik**

Mithilfe einer Gensequenzierung kann eine Mutation im GAA-Gen nachgewiesen werden (Schuller, Kornblum et al. 2013). Eine Registrierung aller bisher bekannten Mutationen ist in der Rotterdamer Datenbank seit 2004 möglich ([www.pompecenter.nl](http://www.pompecenter.nl)).

### **1.3.7.3 Bildgebende Diagnostik**

Bildgebende Verfahren wie z.B. eine Muskelsonographie oder eine MRT-Untersuchung der Muskulatur können in der Diagnostik des Morbus Pompe von zusätzlichem Nutzen sein. Bei adulten Morbus Pompe Patienten sind im T1-gewichteten MRT Muskelveränderungen dokumentiert, die durch fettigen Gewebersatz hell erscheinen (Lollert, Stihl et al. 2018). Es zeigt sich bei Patienten mit LOPD eine gute Korrelation zwischen der Gewebeeränderung (fat fraction) und klinischen Parametern (z.B. 6-minute walk-test, Spirometrie). Ultraschalluntersuchungen der Skelettmuskulatur sind vor allem bei adulten Morbus Pompe Patienten sinnvoll, um eine frühzeitige Diagnose von LOPD zu stellen, auch bei Patienten mit bisher diskreten klinischen Symptomen. Bei infantilen Morbus Pompe Patienten ist im Vergleich zu adulten Morbus Pompe Patienten die Muskelsonographie nicht als frühzeitiges Screening Tool hilfreich, da selbst Patienten mit klinisch stark ausgeprägter Symptomatik unauffällige Befunde zeigen können (Vill, Schessl et al. 2015). Jedoch sind auch bei infantilen Morbus Pompe Patienten MRT-Untersuchungen der Abdominal-, bzw. Rumpfmuskulatur sinnvoll, um den Krankheitsverlauf unter Therapie objektivieren zu können (Peng, Hwu et al. 2016).

### **1.3.7.4 Laborchemische Diagnostik**

Einige Patienten mit LOPD zeigen eine isolierte CK-Erhöhung bis zu 500 – 2000 U/l (Toscano and Schoser 2013). Vor allem bei Patienten mit Vorliegen einer Myopathie vom Gliedergürteltyp oder unklarer, persistierender CK-Erhöhung sollte eine weiterführende Diagnostik (u.a. Trockenbluttest) zum Ausschluss eines Morbus Pompe durchgeführt werden (Klein 2016).

### **1.3.7.5 Muskelbiopsie**

Seit Etablierung der GAA-Enzymaktivitätsmessung mittels Trockenbluttest und der Möglichkeit der genetischen Untersuchung ist die Muskelbiopsie als invasives Verfahren nicht mehr zur Diagnosestellung empfohlen. Bei unklaren Fällen kann die Muskelhistologie jedoch sinnvoll sein. Die Muskelbiopsien von Patienten mit Morbus Pompe zeigen histologisch eine vakuoläre Myopathie, wobei der Schweregrad sehr unterschiedlich stark ausfallen kann (Golsari, Nasimzadah et al. 2018). Infantile Morbus Pompe Patienten zeigen häufig schwere histopathologische Veränderungen (Schänzer, Kaiser et al. 2017). LOPD Patienten mit mitunter milden klinischen Symptomen weisen häufig eine geringer ausgeprägte Muskelpathologie auf (Schoser, Muller-Hocker et al. 2007).

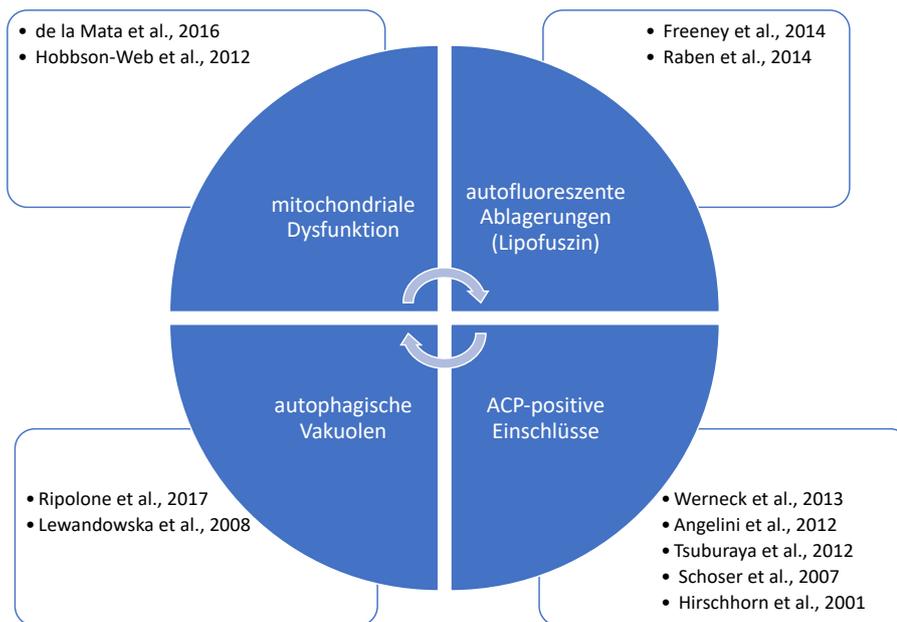
Zusammenfassend zeigt sich vor allem bei LOPD Patienten die Muskelpathologie sehr heterogen (Muller-Felber, Horvath et al. 2007). Eine Vielzahl an Studien hat sich bisher mit den histopathologischen Veränderungen bei LOPD Patienten genauer beschäftigt (Tabelle 3, Abb. 2):

**Tabelle 3: Literaturübersicht über histopathologische Analysen der Skelettmuskulatur bei Patienten mit Morbus Pompe**

Autor	Patientenkohorte	Morphologie der Skelettmuskulatur (licht- und elektronenmikroskopisch)
Hirschhorn et al., 2001	Überblick LOPD, IOPD	- gesteigerte Glykogenakkumulation in verschiedenen Gewebearten (Skelettmuskel, glatte Muskulatur)
Schoaser et al., 2007	38 LOPD	<ul style="list-style-type: none"> <li>- positive saure-Phosphatase Reaktion</li> <li>- vakuolisierte Muskelfasern</li> <li>- Beschreibung von lysosomalem sowie extralysosomalem Glykogen</li> </ul>
Lewandowska et al., 2008	3 LOPD	<ul style="list-style-type: none"> <li>- autophagische Vakuolen</li> <li>- vergrößerte Lysosomen mit intralysosomaler Glykogenakkumulation + "freiem" (zytoplasmatischem) Glykogen</li> </ul>
Angelini et al., 2012	Überblick LOPD	<p><u>vor ERT:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- positive saure-Phosphatase Vakuolen</li> </ul> <p><u>nach ERT:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Rückgang der Vakuolisierung</li> <li>- geringere saure-Phosphatase Reaktion</li> </ul>
Hobbson-Web et al., 2012	1 LOPD	<ul style="list-style-type: none"> <li>- vakuoläre Myopathie, v.a. M. quadriceps femoris</li> <li>- PAS positive membrangebundene Einschlüsse</li> <li>- lysosomales Glykogen, geschwollene Mitochondrien</li> </ul>
Tsuburaya et al., 2012	2 LOPD	- saure-Phosphatase positive Einschlüsse, <i>LAMP-2</i> und <i>LC-3</i> positiv, fehlende Vakuolisierung
Werneck et al., 2013	13 LOPD, 6 IOPD	- Vakuolisierung, saure-Phosphatase positive Einschlüsse
Feeney et al., 2014	22 LOPD	- autofluorescente Einschlüsse, Sudan Black positiv, "muscle lipofuscinosis"

Raben et al., 2014	Überblick, GAA-KO Mouse	- Anstieg des lysosomalen sowie zytoplasmatischen Glykogens - Anhäufung von Autophagosomen - Autofluoreszente Lipofuszin Einschlüsse
Schaaf et al., 2015	Überblick LOPD, IOPD	- Ineffiziente Aktivierung der Satellitenzellen im Muskelgewebe ( <i>Pax7</i> )
de la Mata et al., 2016	Überblick LOPD	- Mitochondriale Dysfunktion - autophagische Vakuolen mit dysmorphen Mitochondrien
Van der Ploeg et al., 2016	16 LOPD	- Glykogen Clearance unter 6-monatiger Enzymersatztherapie: Effekt auf lysosomales Glykogen
Ripolone et al., 2017	18 LOPD	- nach ERT bei 15/18 LOPD Patienten Reduzierung der Glykogenakkumulation sowie Vacuolisierung
Golsari et al., 2018	2 LOPD	- Vacuolisierung mit Glykogenakkumulation kann bei LOPD fehlen

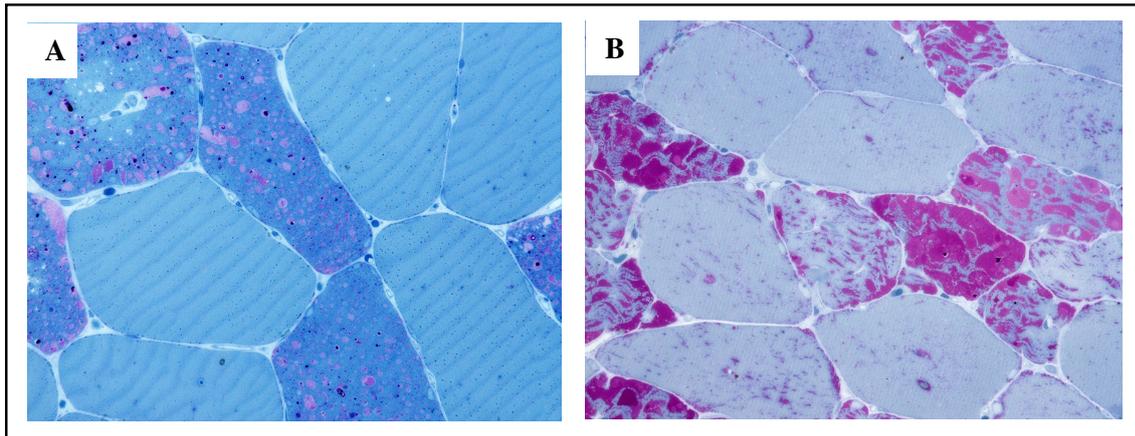
LOPD= Late onset Pompe disease, IOPD= Infantile onset Pompe disease, ERT = Enzymersatztherapie, PAS= Periodic acid-Schiff reaction



**Abbildung 2: Übersicht über die Skelettmuskelpathologie bei LOPD Patienten**

ACP = Acid Phosphatase; saure Phosphatase

Die untersuchten Skelettmuskelzellen weisen pathologische Glykogenablagerungen auf und zeigen als Hinweis auf eine gesteigerte lysosomale Aktivität eine erhöhte saure Phosphatase Reaktion (Engel, Gomez et al. 1973). An Kryostatschnitten sind insbesondere geringe Veränderungen mittels PAS (periodic-acid schiff reaction) nicht immer sicher zu beurteilen. Dagegen kann an glutaraldehydfixiertem Gewebe und PAS gefärbten Semidünnschnitten das in den Muskelfasern akkumulierte Glykogen besser dargestellt werden (Schänzer, Kaiser et al. 2017) (Abb. 3).



**Abbildung 3:** In PAS gefärbten Semidünnschnitten von glutaraldehydfixierten Muskelbiopsien stellt sich Glykogen magentafarben dar. Zwei LOPD Patienten mit unterschiedlich stark ausgeprägter Muskelpathologie ((A) P6- geringgradige Glykogenakkumulierungen; (B) P13- hochgradige Glykogenakkumulierungen), Vergrößerung x400.

Die Glykogenakkumulation ist häufig nicht nur intralysosomal, sondern bei rupturierten Lysosomen auch im Zytoplasma der Muskelzellen zu finden (Abb. 3, B). In diesem fortschreitenden Prozess der Zellzerstörung sind viele membrantragende autophagische Vakuolen beteiligt (Lewandowska, Wierzba-Bobrowicz et al. 2008). Auch Lipofuszinablagerungen sind histopathologisch bei LOPD Patienten beschrieben worden. Einige Patienten weisen in der Muskelbiopsie allenfalls eine geringgradige vakuoläre Myopathie auf, sodass die Diagnose erschwert sein kann. Hilfreich ist die Anfärbung mit saurer Phosphatase (ACP), die mitunter positiv angefärbte zytoplasmatische kugelförmige Einschlüsse zeigt (Tsuburaya, Monma et al. 2012).

In Muskelbiopsien von infantilen Patienten wurden im Rahmen eines Therapiemonitorings bereits Veränderungen unter Enzymersatztherapie beschrieben. Bei Therapiebeginn noch nicht schwerer beschädigter Muskulatur konnte nach 72 Wochen der Therapie ein Rückgang der pathologischen Glykogenspeicherung sowie eine Verbesserung der Zellarchitektur beschrieben werden (Winkel, Kamphoven et al. 2003; Thurberg, Lynch Maloney et al. 2006). Dies zeigt, dass auf der Suche nach weiteren Biomarkern für das Therapieansprechen, den individuellen Krankheitsverlauf und für ein besseres Verständnis der Pathomechanismen die Analyse der Muskelbiopsie eine wichtige Untersuchung bei der Erkrankung des Morbus Pompe ist.

### 1.3.8 Therapie – Morbus Pompe

#### 1.3.8.1 Enzymersatztherapie (ERT)

Als eine der wenigen lysosomalen Speichererkrankungen ist Morbus Pompe eine therapierbare Erkrankung, die nicht nur auf supportiven Maßnahmen beruht, sondern durch personalisierte Therapiestrategien behandelbar ist. Im Jahre 2004 wurde erstmalig bei wenigen Patienten eine Therapie mit rekombinatem humanen Enzymersatz aus Hasenmilch begonnen (Van den Hout, Kamphoven et al. 2004).

Seit 2006 gibt es eine Enzymersatztherapie mit rekombinanter humaner alpha-Glucosidase, gewonnen aus Ovarienzellen des chinesischen Hamsters, die bei infantilen und adulten Morbus Pompe Patienten ihren Einsatz findet (Kishnani, Nicolino et al. 2006). Die Therapie wird intravenös alle 14 Tage verabreicht (20 mg/kg Körpergewicht) (Hundsberger, Hohl et al. 2010). Eine Studie aus dem Jahr 2016 hat den Effekt der Enzymersatztherapie (ERT) mittels rekombinanter humaner alpha-Glucosidase (*rh-GAA*, Myozyme) bei LOPD Patienten untersucht. Hierbei gelang es neben der Verbesserung der klinischen Symptome (Muskelkraft, respiratorische Funktion, Beweglichkeit) den Therapieeffekt auf histopathologischer Ebene zu dokumentieren. Es zeigte sich durch eine Reduzierung der pathologischen intralysosomalen Glykogenakkumulation eine signifikante Glycogenclearance im Muskelgewebe (van der Ploeg, Carlier et al. 2016). Seit der Zulassung der Therapie wurde auch die Tolerierbarkeit für die Patienten beobachtet. Als Nebenwirkungen sind nach der Enzymersatztherapie (ERT) allergische Reaktionen wie Hautausschläge, Schüttelfrost und Fieber beschrieben (van der Ploeg and Reuser 2008). Unter der Therapie kann es ebenfalls zu einer vermehrten Antikörperbildung gegen das infundierte Protein kommen. Bei einer Enzymersatztherapie > 4 Jahre kann die Antikörperbildung gegen die *rh-GAA* abnehmen und sich die Effektivität der Therapie wieder erhöhen (Masat, Laforet et al. 2016). Eine komplette Korrektur der Enzymdefizienz ist nicht erforderlich. Vielmehr reicht ein Zielwert von 30% des Normwertes der GAA-Enzymaktivität aus, um zu einem Rückgang der Krankheitserscheinungen zu führen (van der Ploeg and Reuser 2008). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass ein früher Therapiebeginn bei infantilen Patienten mit einem guten Ansprechen einhergeht (Thurberg, Lynch Maloney et al. 2006). Allerdings zeigen Einzelfalldarstellungen, dass auch ein früher Beginn der Enzymersatztherapie (ERT) nicht immer mit einem guten Ansprechen einhergehen muss (Schänzer, Giese et al. 2017). Die Glycogenclearance unter der Therapie zeigt sich zuerst

in Endothelzellen bzw. glatten Muskelzellen der Blutgefäße. Erst nach einigen Monaten der Therapie erfolgt ein Abbau des akkumulierten Glykogens in den Skelettmuskelzellen (van der Ploeg and Reuser 2008). Das intravenös zugeführte Enzym kann allerdings nur in geringem Maße das Gewebe in der Skelettmuskulatur erreichen. Ursächlich sind eine mangelnde Durchblutung sowie eine reduzierte Mannose-6-Phosphat-Rezeptorexpression an den Skelettmuskelzellen, welche für die endozytotische Aufnahme des Substrats in die Zellen benötigt wird (Cardone, Porto et al. 2008). Als bisher dokumentierte Biomarker sind die Tetra-Saccharidglucose (*Glc4*), Myostatin sowie der insulin like growth factor-1 (*IGF-1*) beschrieben. Patienten mit einem besseren Therapieansprechen scheinen einen niedrigeren *Glc4* Spiegel zu besitzen (Bobillo Lobato, Jiménez Hidalgo et al. 2016). Neben dem unterschiedlichen Ansprechen sind auch die Wirkmechanismen der Therapie nicht vollständig geklärt. Biomarker zum besseren Therapiemonitoring sind aus diesem Grunde dringend erforderlich. Neben einer frühzeitigen Diagnose ist der Zeitpunkt des Therapiebeginns essentiell für den weiteren Krankheitsverlauf. Bei LOPD Patienten zeigt sich, dass das Therapieansprechen bei weit fortgeschrittener Erkrankung schlechter ausfällt (Alejaldre, Diaz-Manera et al. 2012). Schon seit einiger Zeit wird nach Faktoren gesucht, welche für eine mildere Ausprägung der Erkrankung des Morbus Pompe im Erwachsenenalter verantwortlich sind (Engel, Gomez et al. 1973). Ebenso stellt sich die Frage, welche Faktoren für einen besonders schweren Krankheitsverlauf verantwortlich sind. Eine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung des Morbus Pompe und der Restenzymaktivität des Enzyms der alpha-Glucosidase ist inzwischen bekannt. So weisen infantile Morbus Pompe Patienten in der Regel eine GAA-Restenzymaktivität von <1% auf (van der Ploeg and Reuser 2008).

### 1.3.8.2 Supportive Maßnahmen

Bei Patienten mit LOPD tritt meist eine fortschreitende Myopathie mit Betonung einer proximalen Skelettmuskelschwäche auf (Crescimanno, Modica et al. 2015). Ebenso ist die progressiv verlaufende respiratorische Insuffizienz ein häufiges Symptom (van der Ploeg, Carlier et al. 2016). Die unterstützenden therapeutischen Maßnahmen zielen demnach auf eine Stabilisierung der motorischen Funktionen sowie ein Verhindern von Sekundärkomplikationen wie unter anderem dem Auftreten von respiratorischen Infekten ab. Mittels manueller Techniken wird das Abhusten von Schleim gefördert und mögliche Infektionen werden frühzeitig antibiotisch behandelt. Eine jährliche Gripeschutzimpfung sowie insbesondere Impfungen gegen Keuchhusten und invasive Pneumokokken sind bei allen Morbus Pompe Patienten empfohlen (www.lysolutions.de). Auch kann bei nächtlicher Hypoventilation eine *BiPAP* Beatmung („bivlevel positive airway pressure“) hilfreich sein (Schuller, Kornblum et al. 2013).

### 1.3.8.3 Gentherapie - Neue Therapien zum Teil bereits in klinischer Forschung

Ein bekannter Einflussfaktor der Enzyersatztherapie (ERT) ist die Immunreaktion gegen das verabreichte Fremdprotein. Neue Ansätze im Bereich der Gentherapie mittels adeno-assoziiertem Virusvektor könnte diese Immunreaktion unterdrücken und für eine bessere Therapieeffektivität sorgen (Bond, Kishnani et al. 2017). Eine Studie zeigte im Tiermodell, dass eine ERT begleitende Gentherapie mittels *AAV* (adeno-assoziiertem Virusvektor) die GAA-Aktivität erhöht und die Glykogenakkumulation sowie die Anti-GAA Antikörperbildung reduziert werde (Han, Ronzitti et al. 2017). Neben dieser Therapiestrategie ist der Mannose-6-Phosphat Rezeptor (*M6P*) ein Zielmolekül in der Weiterentwicklung besserer Therapieoptionen. Die Grundlage bildet das Verständnis über die Verarbeitung des in den Körperzellen hergestellten Proteinmoleküls der alpha-Glucosidase. Diese durchläuft posttranslationale Modifikationen im zelleigenen Endoplasmatischen Retikulum, bei denen Prozesse der Glykosylierung bzw. Phosphorylierung ablaufen. Diese Arbeitsprozesse sorgen unter anderem für ein Mannose-6-Phosphat Gerüst, welches als Erkennungssignal für das Andocken an das Lysosom verantwortlich ist. Dies ist Voraussetzung für einen ungestörten Transportprozess in das Zellorganell, in welchem das Protein als Enzym seine Funktion ausüben soll (Hirschhorn 2001). Bei der Enzyersatztherapie vermutet man eine zu

geringe Anzahl an *M6P*-Bindungsmolekülen, weshalb die Affinität des therapeutischen Enzyms an den *M6P*-Rezeptor reduziert ist (Cardone, Porto et al. 2008). Eine Studie aus dem Jahr 2017 zeigte, dass *M6P*-Analoga, sogenannte *AMFA* (isosterische Analoga von *M6P* in der anomeren Position) zusätzlich zur Enzyersatztherapie in Mausmodellen zu verbesserten Muskelfähigkeiten führte (Basile, Da Silva et al. 2018). Ebenso ist bekannt, dass das Vorhandensein von verschiedenen Enzym polymorphismen im *ACE*- (Angiotensin-Converting-Enzym) oder *ACTN3*- (alpha actinin 3) Molekül den klinischen Phänotyp der LOPD Patienten sowie den Therapieerfolg bei Enzyersatztherapie (ERT) beeinflussen kann (De Filippi, Saeidi et al. 2014; Baek, Palmer et al. 2016).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Patienten mit LOPD zeigen einen sehr heterogenen klinischen Phänotyp, wobei nicht vollständig geklärt ist, welche Faktoren dafür verantwortlich sind. Auch die Muskelpathologie der LOPD Patienten zeigt sich in ihrem Ausprägungsgrad sehr variabel. Diese ist in bisherigen Studien schon sehr detailliert beschrieben worden (Hirschhorn 2001; Schoser, Muller-Hocker et al. 2007; Angelini and Semplicini 2012; Tsuburaya, Monma et al. 2012; Ripolone, Violano et al. 2017) (Tabelle 3, Abb. 2). Neben der pathologischen Glykogenakkumulation wird auch eine gestörte Autophagie ursächlich für die Muskelpathologie angesehen (Lewandowska, Wierzba-Bobrowicz et al. 2008; Feeney, Austin et al. 2014; Lim, Li et al. 2014; de la Mata, Cotán et al. 2016). An Muskelbiopsien von infantilen Morbus Pompe Patienten wurde ein myopathologischer Score entwickelt, der an fixierten, sehr kleinen Proben angewendet werden kann. In dem Score wurden nicht nur Glykogenablagerungen, sondern zusätzlich pathologische Veränderungen der myofibrillären Architektur und einer gestörten Autophagie erfasst. Es konnte gezeigt werden, dass eine stark geschädigte Skelettmuskulatur mit einem schlechteren Ansprechen auf eine Enzymersatztherapie einhergeht (Schanzer, Kaiser et al. 2017).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Grad der Muskelpathologie bei Patienten mit LOPD zu untersuchen. Eine systematische morphometrische Analyse der Muskelpathologie wurde bisher noch nicht an einer großen Kohorte von LOPD Patienten durchgeführt (Schoser, Muller-Hocker et al. 2007; Werneck, Lorenzoni et al. 2013; Lim, Li et al. 2014; van der Ploeg, Carlier et al. 2016; Ripolone, Violano et al. 2017) (Tabelle 3). In vorliegender Studie wurde der an infantilen Morbus Pompe Patienten etablierte Muskelscore weiterentwickelt und für die in der Studie eingeschlossenen adulten Morbus Pompe Patienten erhoben. Die Analysen erfolgten an in Kunststoff eingebettetem Gewebe von 53 Patienten mit LOPD und 10 Kontrollpatienten. Neben der Bestimmung der Glykogenakkumulation und dem Ausmaß pathologischer Vakuolen wurde auch der Fibrosegrad semiquantitativ bestimmt. Die Ergebnisse des myopathologischen Phänotyps wurden dann mit klinischen Daten wie z.B. dem Alter bei Erkrankungsbeginn, der Erkrankungsdauer, dem Geschlecht, Laborparametern wie der Höhe der Creatinkinase und insbesondere mit dem genetischen Phänotyp von 37 LOPD Patienten korreliert. Bei einer positiven Korrelation zwischen dem myopathologischen Phänotyp und dem zugrunde liegenden genetischen Phänotyp wäre mitunter, durch das in einigen Ländern

bereits etablierte Neugeborenen-Screening, die Möglichkeit gegeben eine Vorhersage über die Krankheitsprognose von identifizierten Morbus Pompe Patienten treffen zu können. Neben einem besseren Krankheitsverständnis könnten diese Erkenntnisse genutzt werden, um ein besseres Therapiemonitoring zu ermöglichen und Faktoren zu identifizieren, die einen unterschiedlichen Krankheitsverlauf prognostizieren können.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Studienkohorte**

In der vorliegenden retrospektiven Studie wurde die Muskelpathologie von 53 Patienten mit Morbus Pompe im Erwachsenenalter (LOPD) morphometrisch analysiert. Die Diagnose eines Morbus Pompe wurde durch die Bestimmung der GAA (acid alpha glucosidase gene) - Enzymaktivität und durch die genetische Testung gesichert. Die Patientenkohorte umfasste 29 männliche Patienten, im Median 46 (16-78) Jahre alt sowie 24 weibliche Patienten, im Median 41 (14-72) Jahre alt bei Biopsie. Für die Studie sind uns die Muskelbiopsien, klinische Daten und Laborparameter von verschiedenen Pompe Zentren in Deutschland (Berlin, Halle, München, Aachen, Magdeburg, Münster, Bonn) zur Verfügung gestellt worden. Die Muskelbiopsien wurden zur Diagnostik vor Beginn einer Enzyersatztherapie (ERT) entnommen. In der Mehrzahl der Fälle (31/53 Patienten) erfolgte die Muskelbiopsie aus dem Bereich der proximalen Beinmuskulatur (M. vastus lateralis). Von 11 Patienten entstammten die Biopsien aus dem Bereich der proximalen Armmuskulatur, von 5 Patienten aus der Schultermuskulatur, von 2 Patienten aus dem Bereich der Unterschenkelmuskulatur sowie bei einem Patienten aus der Brustmuskulatur (Tabelle 4).

Zusätzlich wurden Muskelbiopsien von 10 Patienten ohne Diagnose eines Morbus Pompe als Kontrollen untersucht (Tabelle 5). Diese Patienten wurden in der Universitätsklinik Gießen/Marburg (UKGM) rekrutiert. Die Kontrollgruppe bildeten 7 männliche Patienten, im Median 52 (32-66) Jahre alt sowie 3 weibliche Patienten, im Median 41 (30-73) Jahre alt bei Biopsie. 7 Patienten zeigten als Muskelpathologie eine geringgradige Kalibervariation, zwei Patienten eine Muskelatrophie sowie ein Patient eine mäßiggradige Kalibervariation (Tabelle 5).

Für die Studie liegt ein positives Ethikvotum von der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen vor (AZ.:07/09). Die Patientendaten wurden für diese Studie pseudonymisiert und für die Doktorarbeit anonymisiert.

**Tabelle 4: Verteilung des Geschlechts, Alter bei Biopsie und Lokalisation der Muskelbiopsie der LOPD Patienten (n=53)**

Patient	Pompe Zentrum	Geschlecht	Alter bei Biopsie	Lokalisation der Biopsie
P1	Berlin	m	36	M. vastus lat.
P2	Berlin	m	19	M. quadriceps femoris
P3	Berlin	m	33	M. biceps brachii
P4	Berlin	w	35	M. vastus lat.
P5	Berlin	m	51	M. vastus lat.
P6	Berlin	m	45	M. biceps femoris
P7	Berlin	m	50	/
P8	Berlin	w	42	/
P9	Halle	m	37	M. biceps brachii
P10	Halle	m	26	M. biceps brachii
P11	Halle	m	31	M. vastus lat.
P12	Halle	m	46	M. biceps brachii
P13	Halle	w	31	M. biceps brachii
P14	Halle	w	34	M. tibialis ant.
P15	Halle	w	45	M. biceps brachii
P16	Halle	m	78	M. vastus lat.
P17	Halle	w	62	M. vastus lat.
P18	München	m	49	M. rectus femoris
P19	München	m	28	M. biceps brachii
P20	München	m	51	M. pectineus
P21	München	m	16	M. vastus lat.
P22	München	m	62	M. deltoideus
P23	Aachen	w	22	M. vastus lat.
P24	Aachen	w	25	M. vastus lat.
P25	Aachen	w	22	M. vastus lat.
P26	Magdeburg	w	42	M. vastus lat.
P27	Magdeburg	w	35	M. vastus lat.
P28	Bonn	w	14	M. vastus lat.
P29	Bonn	m	61	M. vastus lat.
P30	Bonn	w	51	M. vastus lat.
P31	Bonn	m	42	M. vastus lat.
P32	Bonn	m	50	M. vastus lat.
P33	Bonn	m	58	M. vastus lat.
P34	Bonn	m	50	M. vastus lat.
P35	Bonn	m	30	M. vastus lat.
P36	Bonn	m	58	M. vastus lat.
P37	Bonn	w	38	M. biceps brachii
P38	Bonn	w	50	M. biceps brachii
P39	Bonn	m	34	/
P40	Bonn	w	49	M.vastus lat.
P41	Bonn	w	40	M. vastus lat.
P42	Bonn	m	49	M. deltoideus
P43	Bonn	m	65	M. biceps brachii

P44	Bonn	w	50	M. deltoideus
P45	Bonn	w	45	M. tibialis ant.
P46	Bonn	m	31	M. quadriceps femoris
P47	Bonn	w	27	M. vastus lat.
P48	Bonn	w	53	M. vastus lat.
P49	Bonn	w	72	M. vastus lat.
P50	Bonn	w	50	M. biceps brachii
P51	Münster	m	37	M. deltoideus
P52	Münster	m	58	M. vastus lat.
P53	Münster	w	55	M. deltoideus

w= weiblich, m = männlich, M. = Musculus

**Tabelle 5: Verteilung des Geschlechts, Alter bei Biopsie und Lokalisation der Muskelbiopsie der Kontrollpatienten (n=10)**

Patient	Geschlecht	Alter bei Biopsie (J)	Lokalisation der Biopsie	Muskelpathologie
K1	w	41	M. deltoideus	geringgradige Kalibervariation
K2	m	63	M. quadriceps	geringgradige Kalibervariation
K3	m	50	M. gastrocnemius	geringgradige Kalibervariation
K4	m	34	M. vastus lat.	geringgradige Kalibervariation
K5	m	32	M. deltoideus	geringgradige Kalibervariation
K6	w	73	M. gastrocnemius	neurogene Muskelatrophie
K7	m	66	-	mäßige Kalibervariation
K8	m	57	-	geringgradige Kalibervariation
K9	m	52	-	Muskelatrophie
K10	w	30	M. vastus lat.	geringgradige Kalibervariation

### **3.2 Klinische Befunde der LOPD Patienten**

Die klinischen und laborchemischen Befunde der Patienten wurden retrospektiv erhoben (Tabelle 6). Die angegebene GAA-Restenzymaktivität wurde von den Pompe Zentren mittels Trockenbluttest bzw. im Muskelgewebe bestimmt. Es gelang hiernach eine Normierung der verschiedenen Einheiten in eine Prozentangabe des jeweiligen Sollwertes, sodass die Parameter untereinander im Verlauf verglichen werden konnten. Bei den klinischen Parametern standen vor allem das Alter der Patienten bei Symptombeginn, das Alter der Patienten bei Biopsieentnahme/Diagnose und die hieraus resultierende individuelle Krankheitsdauer im Vordergrund (Tabelle 7).

Die genetische Untersuchung des GAA-Gens wurde jeweils in den Pompe Spezialambulanzen durchgeführt. Für die Erkrankung des Morbus Pompe im Erwachsenenalter (LOPD) sind zwei pathologische Mutationen auf zwei verschiedenen Allelen des Chromosom 17 des GAA-Gens verantwortlich. In dieser Studie wurden die Befunde mit den Angaben aus der Literatur und der Rotterdamer Datenbank (<http://cluster15.erasmusmc.nl/klgn/pompe/mutations.html>) verglichen. Von 37 LOPD Patienten standen uns Informationen über die Mutationen im GAA-Gen zur Verfügung.

**Tabelle 6: Vorlage zur retrospektiven Erfassung der klinischen Befunde und Laborparameter der LOPD Patienten**

Nummer	Geschlecht	Allel 1	Allel 2	Alter bei Symptombeginn (J)	Alter bei Biopsie (J)	Krankheitsdauer (J)	Biopsieort	CK (U/L) *	GAA-Restenzymaktivität **

J= Jahre, \*CK in Units pro Liter gemessen zum Biopsiezeitpunkt, \*\* in %/Normwert

**Tabelle 7: Klinische Angaben und Laborparameter von 53 LOPD Patienten**

	Geschlecht	Allel 1	Allel 2	Alter bei Symptombeginn (J)	Alter bei Biopsie (J)	Krankheitsdauer (J)	Biopsieort	CK (U/L) *	GAA Restenzymaktivität **
P1	M	c.-32-13T>G	c.1076-1G>A	30	36	6	MQF	1148	/
P2	M	/	/	8	19	11	MQF	860	/
P3	M	c.-32-13T>G	c.525delT	31	33	2	MBF	1767	/
P4	F	c.-32-13T>G	c.2407C>T	/	34	/	MVL	317	/
P5	M	/	/	39	51	12	MVL	208	/
P6	M	c.-32-13T>G	bpDelIVS16+102_IVS17+31)	43	44	1	MBF	492	/
P7	M	/	/	/	50	/	/	/	/
P8	F	c.-32-13T>G	c.1548G>A	26	42	16	/	536	/
P 9	M	c.-32-13T>G	c.794delG	36	37	1	MBB	1062	/
P 10	M	c.-32-13T>G	c.794delG	13	26	13	MBB	1734	/
P 11	M	c.-32-13T>G	c.1495T>A	/	31	/	MVL	1542	/
P 12	M	c.-32-13T>G	c.307T>G	/	46	/	MBB	690	/
P 13	W	c.-32-13T>G	c.2078_insA	/	31	/	MBB	96	/
P 14	W	c.1655T>C	c.1478C>T	27	34	7	MTA	522	/
P 15	W	c.-32-13T>G	c.1655T>C	35	45	10	MBB	564	/
P 16	M	c.-32-13T>G	c.925G>A	73	78	5	MVL	156	/
P 17	W	c.-32-13T>G	c.525delT	45	62	17	MVL	246	/
P 18	M	c.-32-13T>G	c.1942G>A	47	49	2	MRF	644	39%
P 19	M	c.-32-13T>G	c.2055C>A	24	28	4	MBF	1372	24%
P 20	M	c.-32-13T>G	c.1829C>T	49	51	2	MP	541	30%
P 21	M	c.-32-13T>G	c.1064T>C	15	16	1	MVL	712	21%
P 22	M	c.-32-13T>G	c.1075G>A	55	62	7	MD	347	27%
P 23	W	c.-32-13T>G]	/	12	22	10	MVL	502	7,4%
P 24	W	c.-32-13T>G]	c.525delT	20	25	5	MVL	645	/
P 25	W	c.-32-13T>G	c.2608C>T	20	22	2	MVL	580	9,09%

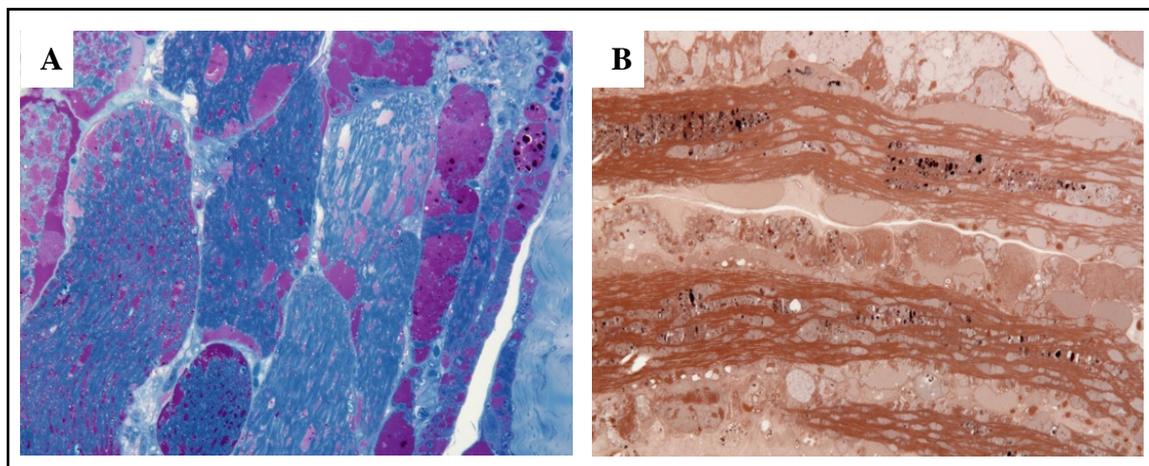
P 26	W	/	/	40	42	2	MVL	103	17,48%
P 27	W	c.-32-13T>G	/	32	35	3	MVL	540	3,84%
P 28	W	c.-32-13T>G	c.1822C>T	/	14	/	MVL	900	13,11%
P 29	M	c.-32-13T>G	c.1127delGinsc	58	61	3	MVL	310	18,03%
P 30	W	c.-32-13T>G	c.525delT	47	51	4	MVL	681	5,90%
P 31	M	/	/	/	42	/	MVL	/	18,03%
P 32	M	c.-32-13T>G	c.1655T>C	43	50	7	MVL	352	4,59%
P 33	M	/	/	/	58	/	MVL	/	11,48%
P 34	M	c.-32-13T>G	c.118C>T	49	50	1	MVL	428	16,39%
P 35	M	/	/	/	30	/	MVL	/	/
P 36	M	c.-32-13T>G	c.655G>A	39	65	26	MVL	656	31,15%
P 37	W	c.-32-13T>G	c.2242G>T	38	38	0	MBF	524	/
P 38	W	/	/	/	50	/	MBF	/	13,11%
P 39	M	/	/	/	34	/	/	/	24,59%
P 40	W	c.1478C>T	/	/	49	/	MVL	691	21,31%
P 41	W	c.-32-13T>G	c.271delG	/	40	/	MVL	435	22,95%
P 42	M	c.-32-13T>G	c.118C>T	45	49	4	MD	293	/
P 43	M	/	/	/	65	/	MBF	/	18,03%
P 44	W	/	/	/	50	/	MD	/	/
P 45	W	/	/	/	45	/	MTA	/	/
P 46	M	/	/	/	31	/	MQF	/	18,03%
P 47	W	/	/	/	27	/	MVL	/	19,67%
P 48	W	c.-32-13T>G	c.525delT	48	53	5	MVL	220	24,59%
P 49	W	/	/	/	72	/	MVL	/	/
P 50	W	/	/	/	50	/	MBF	/	18,03%
P 51	M	c.-32-13T>G	c.525delT	30	37	7	MD	/	/
P 52	M	c.-32-13T>G	c.525delT	55	58	3	MVL	344	/
P 53	W	536bpDel	c.-32-13T>G	40	55	15	MD	290	/

\*CK gemessen zum Biopsiezeitpunkt, J=Jahre, \*\* in %/Normwert; MQF= Musculus quadriceps femoris, MVL=Musculus vastus lateralis, MBF= Musculus biceps femoris, MBB=Musculus biceps brachialis, MTA= Musculus tibialis anterior, MRF= Musculus rectus femoris, MP= Musculus pectineus, MD= Musculus deltoideus, M= männlich, W= weiblich

### 3.3 Analyse der Muskelpathologie

#### 3.3.1 Anfertigung der Gewebeschnitte

Für die Studie ist in Glutaraldehyd fixiertes und in Kunststoff eingebettetes Skelettmuskelgewebe untersucht worden. Von den Gewebelöcken wurden mit einem Ultramikrotom (Reichert-Jung Ultracut E Ultramicrotome) 1,5 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit verschiedenen Methoden angefärbt, um die Gewebemorphologie, die Glykogenablagerungen und die Lipidablagerungen darzustellen. Für die Analyse der Glykogenablagerungen sowie großen leeren Vakuolen (LEV) wurden PAS gefärbte Semidünnschnitte hergestellt (Abb. 4, A). Die Lipidablagerungen der autophagischen Vakuolen ließen sich vor allem in PPD (p-Phenylenediamin) gefärbten Semidünnschnitten gut darstellen (Schänzer, Kaiser et al. 2017) (Abb. 4, B). (Protokolle s. Anhang, S.96).



**Abbildung 4: Semidünnschnitte einer Muskelbiopsie von einem LOPD Patienten (P 2)**

In der PAS-Färbung kommen die ausgeprägten Glykogenablagerungen in den Muskelfasern magentafarben zwischen den blau gefärbten Myofibrillen gut zur Darstellung (A). In der PPD- Färbung werden die lipophilen Einschlüsse in den autophagischen Vakuolen schwarz angefärbt (B), Vergrößerung x400.

### 3.3.2 Quantifizierung der Muskelpathologie

Die Quantifizierung der Muskelpathologie basierte in vorliegender Studie auf einer bereits an infantilen Morbus Pompe Patienten etablierten Methode (Schänzer, Kaiser et al. 2017).

Im Vergleich zu morphometrischen Analysen anderer bisher publizierter Studien (Thurberg, Lynch Maloney et al. 2006) beinhaltet die in dieser Studie durchgeführte Quantifizierung der Muskelpathologie neben der prozentualen Bestimmung des (lysosomalen und extralysosomalen) Glykogens des Muskelgewebes auch das Vorkommen großer entleerter Vakuolen (LEV). Zusätzlich wurden an der vorliegenden Kohorte von LOPD Patienten semiquantitativ der Fibrosegrad und das Ausmaß der autophagischen Vakuolen im Rahmen der Doktorarbeit von Lara Viergutz bestimmt.

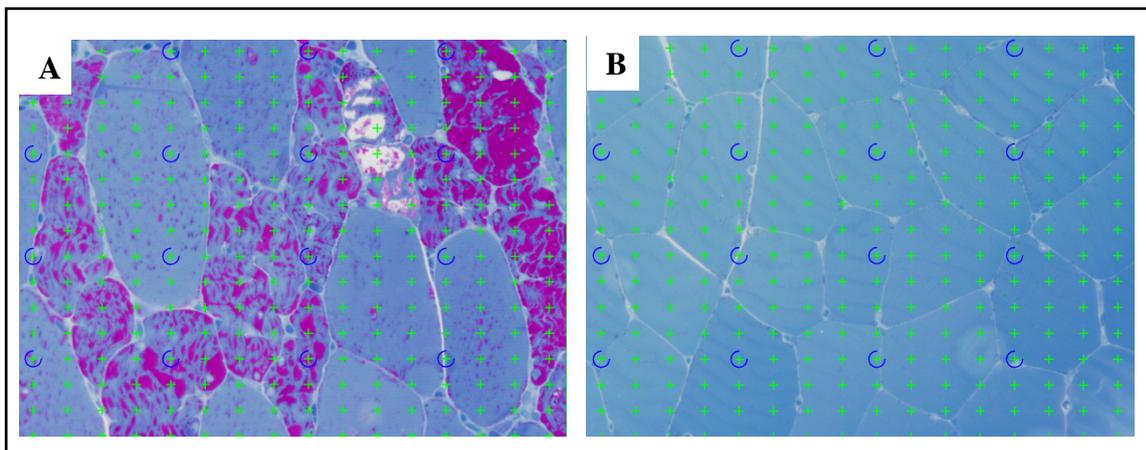
Die modifizierte Analyse der Muskelbiopsien erfolgte an PAS gefärbten Semidünnschnitten am Lichtmikroskop Nikon Eclipse 80 mit Hilfe einer unterstützenden „New CAST“ (ComputerAssistedStereologyTool) Software. Anhand dieses Softwareprogramms (Visiopharm) mit motorisiertem Objektisch (Nikon Eclipse 80) gelang eine maßstabsgerechte Untersuchung des Gewebes, bei der 100% der Fläche an Muskelgewebe ausgewertet werden konnte. Nichtmuskuläres Gewebe wurde dabei ausgespart.

In einem ersten Schritt wurde die Fläche der kompletten Muskelbiopsie (100% Muskelgewebe) umfahren (12,5-fache Vergrößerung), durch das Softwareprogramm in einzelne Schnittbilder unterteilt (Sampling) und digitalisiert. Die Anzahl der einzelnen zu analysierenden Schnittbilder pro Patient richtete sich nach der Größe der ursprünglichen Biopsie und erfolgte immer nach identischem Grid (Kreuzrastereinstellung: 4er Gruppe, 4x4 Kreuze). Die einzelnen Bilder wurden in 400-facher Vergrößerung nach festgelegten Kriterien analysiert.

### 3.3.3 Quantitative Analyse der Glykogenakkumulation und large empty vacuoles (LEV) der Muskelfasern pro Fläche mittels Kreuzraster

Zur besseren Erfassung der im Vergleich zu infantilen Pompe Patienten mitunter geringer ausgeprägten Pathologie erfolgte die Untersuchung der Muskelbiopsien der LOPD Patienten an einem angepassten, engmaschigeren Kreuzraster.

Bei der durchgeführten Analyse wurden im Vergleich zur Etablierung an IOPD Patienten (81 Kreuze/Bild) mittels Kreuzrastermethode 256 Kreuze/Bild ausgewertet (Schänzer, Kaiser et al. 2017). Es wurden dabei das Ausmaß der PAS positiven Flächen (Glykogengehalt), der PAS negativen Flächen und der leeren großen Vakuolen (LEV) der Muskelfaser pro Fläche bestimmt. Jedes eindeutig auf Muskelgewebe liegende Kreuz wurde in die Analyse miteinbezogen und gezählt (Abb. 5).



**Abbildung 5: Muskelpathologie von einem LOPD- und einem Kontrollpatient**

PAS gefärbte Semidünnschnitte von einem Patienten mit LOPD (P9) (A) und eines Kontrollpatienten (K9) (B) mit Darstellung des Auswertungsrasters (256 Kreuze/Bild, Sampling 100%), Vergrößerung x400.

#### Beispielschema:

Analyse der Muskelbiopsie (Glykogen und LEV) eines LOPD Patienten (P9):

PAS + Gewebe	PAS - Gewebe	leere Vakuole	gesamt
633 Kreuze	1807 Kreuze	38 Kreuze	2478 Kreuze
25.54%	72.92%	1.54%	100%

### Analyse der Muskelbiopsie (Glykogen und LEV) eines Kontrollpatienten (K9):

PAS + Gewebe	PAS - Gewebe	leere Vakuole	gesamt
7 Kreuze	2623 Kreuze	0 Kreuze	2630 Kreuze
0.30%	99.70%	0%	100%

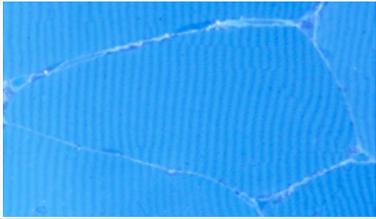
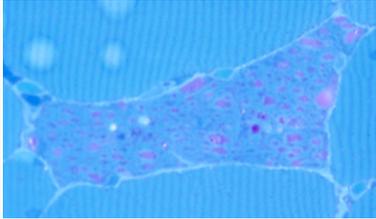
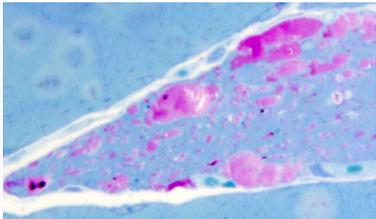
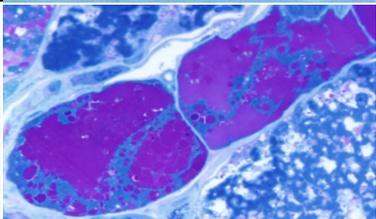
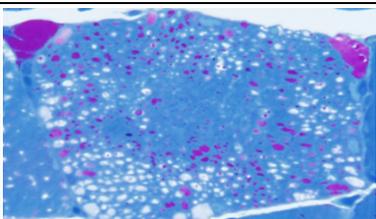
#### **3.3.4 Ermittlung des Muskelscores**

Bei der Analyse der Muskelpathologie wurde neben der Bestimmung des Glykogengehaltes des Muskelgewebes für jeden Patienten ein individueller Muskelscore ermittelt. Diese Auswertung wurde an Muskelbiopsien von Kindern mit Morbus Pompe etabliert (Schänzer, Kaiser et al. 2017) und ist nun erstmals in angepasster Form an einer großen Kohorte (n=53) von Patienten mit LOPD durchgeführt worden.

In einem ersten Schritt wurde die Fläche unter den auszuwertenden Kreuzen des Rasters einem der pathologischen Stadien (Stadien 1-5) bzw. dem physiologischen Stadium (Stadium 0) zugeordnet und prozentual zum Gesamtschnitt bestimmt (Abb. 6).

Anhand dieser prozentualen Flächenangaben konnte ein Muskelscore für jeden Patienten individuell ermittelt werden. Die prozentualen Anteile der einzelnen Stadien wurden mit ihren Stadienziffern multipliziert und anschließend als Summe notiert (Beispiel P9, S.34). Je höher der Muskelscore, desto stärker sind die pathologischen Veränderungen in der Muskelbiopsie der Patienten.

Durch diesen Score ist es möglich die Muskelpathologie anhand eines Zahlenwertes auszudrücken. Diese Quantifizierung der Histopathologie ermöglicht z.B. eine Korrelation mit klinischen Daten und Laborparametern.

Stadium 0		normale Muskelfaser
Stadium 1		feintropfig PAS <10%
Stadium 2		grob tropfig PAS 10-80%
Stadium 3		konfluierend PAS >80%
Stadium 4		gemischte Vakuolen (PAS + und PAS -)
Stadium 5		leere Vakuolen (PAS -) gestörte myofibrilläre Architektur

**Abbildung 6: Darstellung der verschiedenen Stadien der Muskelpathologie**

PAS gefärbte Semidünnschnitte, Vergrößerung x400.

Beispielschema:

Analyse der Muskelbiopsie (Muskelscore) eines LOPD Patienten (P9):

Stadium 0	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3	Stadium 4	Stadium 5	gesamt
170 Kreuze	1175 Kreuze	329 Kreuze	570 Kreuze	82 Kreuze	29 Kreuze	2355 Kreuze
7.22%	49.90%	13.97%	24.20%	3.48%	1.23%	100%

Beispielrechnung:

$$(0.722*0) + (0.499*1) + (0.1397*2) + (0.2420*3) + (0.0348*4) + (0.0123*5) = \mathbf{1.70}$$

Bei dem LOPD Patient (P9) wurde ein Muskelscore von 1,70 ermittelt.

### 3.3.5 Semiquantitative Analyse des Fibrosegrades des Muskelgewebes

Die Ausprägung des Fibrosegrades wurde an PAS gefärbten Semidünnschnitten semiquantitativ untersucht. Die Daten wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Lara Viergutz erhoben und sind in der dortigen Dissertationsschrift genau erläutert.

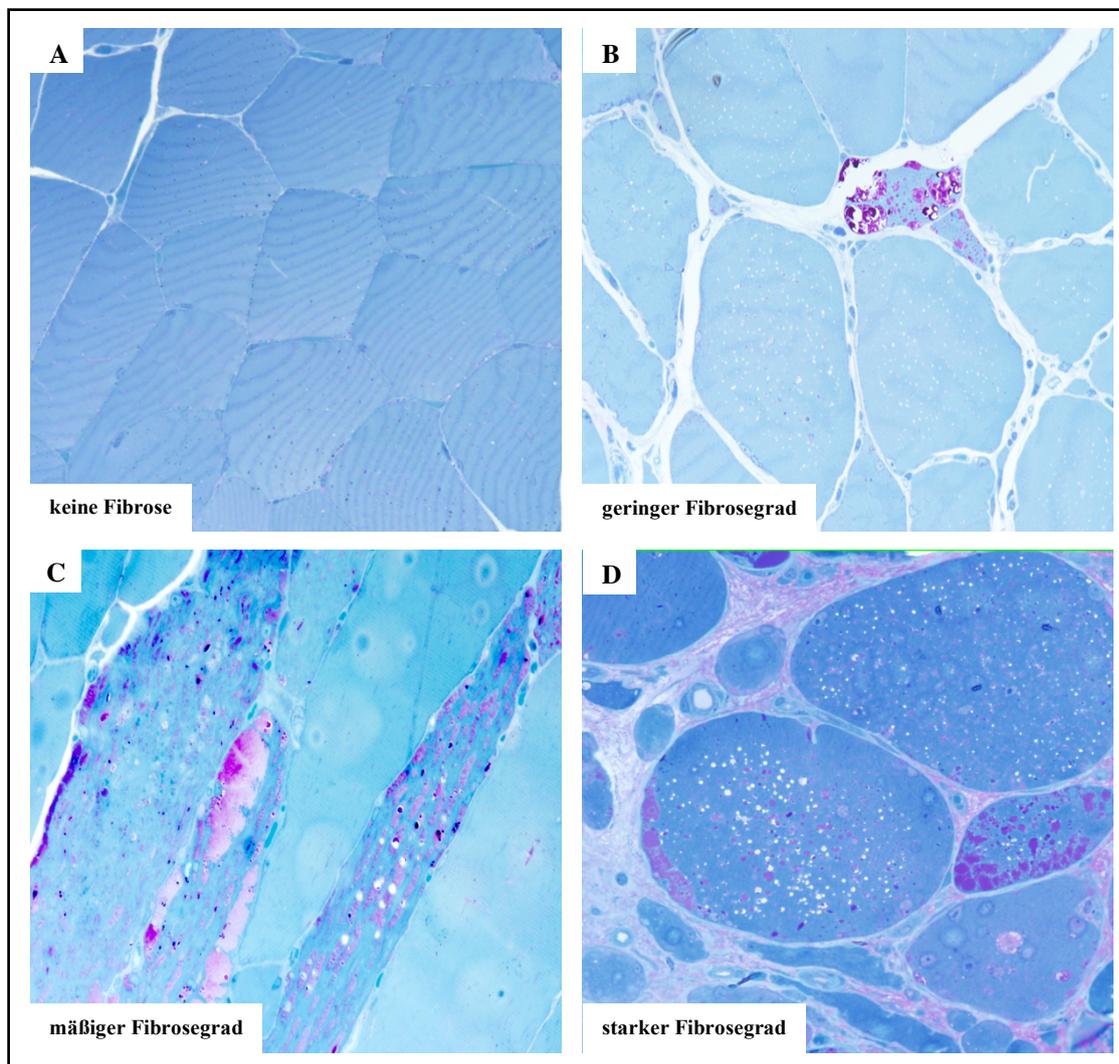
Es wurden 4 Stadien definiert und die Muskelbiopsien wie folgt charakterisiert (Abb.7):

0 – keine Fibrose

1 – geringer Fibrosegrad

2 – mäßiger Fibrosegrad

3 – starker Fibrosegrad

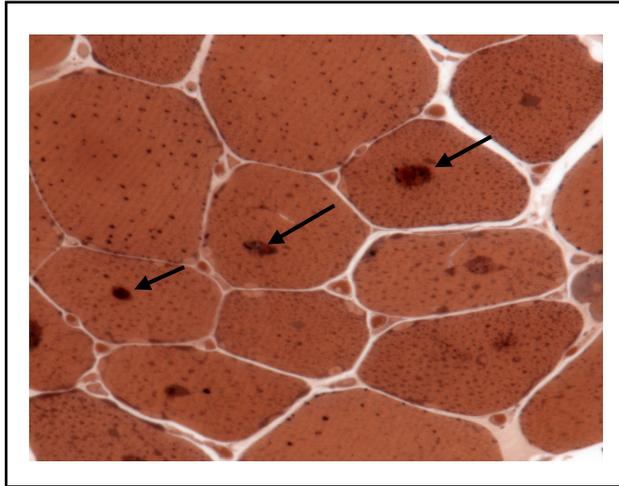


**Abbildung 7: PAS gefärbte Semidünnschnitte mit Darstellung eines unterschiedlichen Fibrosegrades**

Die LOPD Patienten zeigen eine hohe Variabilität zwischen kaum vorhandenen (A), geringen (B) oder mäßigen (C) fibrotischen Veränderungen. Ein starker bindegewebiger Umbau, ausgeprägte Kalibervariationen sowie breite Bindegewebssepten charakterisieren das Bild einer Biopsie mit starken fibrotischen Veränderungen bzw. einem Fibrosegrad 3 (D), Vergrößerung x400.

### 3.3.6 Quantitative Analyse der autophagischen Vakuolen

Das Ausmaß der autophagischen Vakuolen wurde an PPD gefärbten Semidünnschnitten untersucht (Abb.8). Die autophagischen Vakuolen wurden quantitativ pro Muskelfaserfläche bestimmt. Die Daten wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Lara Viergutz erhoben und sind in der Dissertationsschrift genau erläutert.



**Abbildung 8: Autophagische Vakuolen an PPD gefärbtem Semidünnschnitt**

Bei den LOPD Patienten (Bildbeispiel: P 24) stellen sich die autophagischen Vakuolen als Vakuolen mit dunklen Einschlüssen dar (Pfeile), Vergrößerung x400.

### 3.4 Angaben zur Statistik

In vorliegender Studie erfolgte die Untersuchung signifikanter statistischer Zusammenhänge mit dem Computerprogramm *Graph Pad Prism*. Die angegebenen gemittelten Werte entsprechen jeweils dem Median der untersuchten Stichprobe.

Als Analyseverfahren wurden verschiedene Methoden verwendet:

- 1) Korrelationsanalyse zweier Parameter (X/Y) mittels *Spearman-Korrelation* (in logarithmierter sowie entlogarithmierter Darstellung).
- 2) Korrelationsanalyse von 2 Kohorten mittels *Mann-Whitney Test*.
- 3) Korrelationsanalyse von mehreren Kohorten mittels *Kruskal-Wallis Test*.

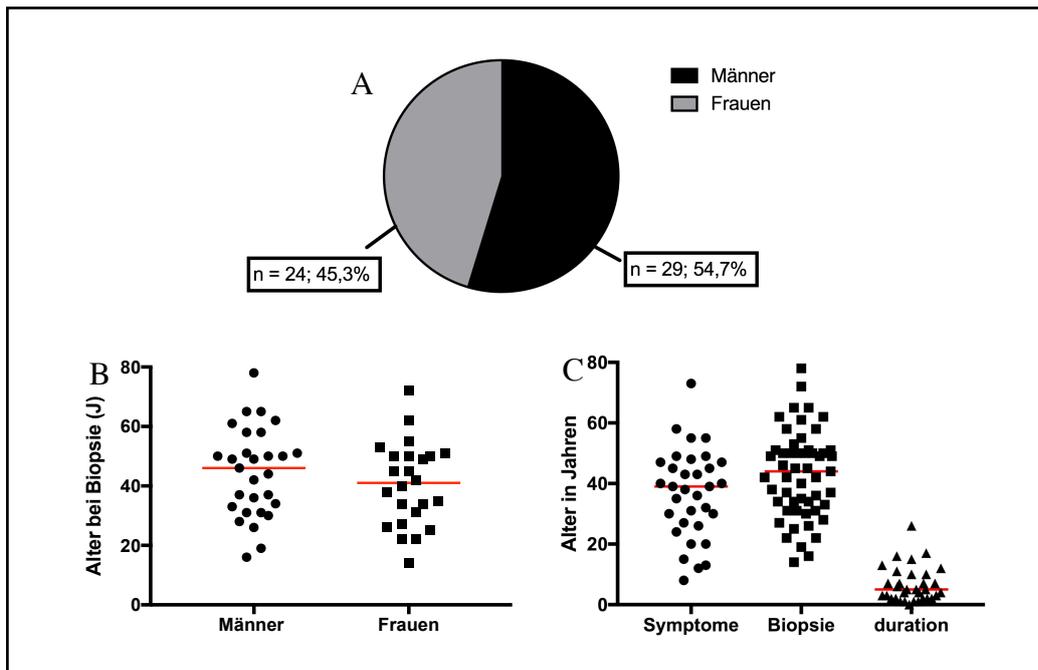
Als signifikante Unterschiede wurden Ergebnisse von  $p < 0.05$  gewertet. In den Korrelationsanalysen (Spearman-Korrelation) wurde der jeweilige Korrelationskoeffizient ( $r$ ) bestimmt. Ein schwacher linearer Zusammenhang lässt sich bei Werten von  $r < 0.5$  interpretieren. Eine mindestens mittlere Stärke ist bei Werten von  $r > 0.5$  anzunehmen.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Darstellung der Studienkohorte**

In der vorliegenden retrospektiven Studie wurde die Muskelpathologie von 53 late onset Pompe disease Patienten (LOPD) systematisch morphometrisch untersucht. Anhand der vorliegenden klinischen Daten zeigte sich eine Verteilung von 29 (54,7%) männlichen und 24 (45,3%) weiblichen Patienten (Abb. 9A).

Zum Biopsiezeitpunkt waren die männlichen Patienten (n=29) 46 Jahre (16-78) und die weiblichen Patienten (n=24) 41 Jahre (14-72) alt (Abb. 1b). Zum Zeitpunkt der Biopsie lag das Alter von allen 53 Patienten bei 44 Jahren (14-78) (Abb. 9C). Der jüngste Patient war 14 Jahre, der älteste Patient 78 Jahre alt bei Biopsie. Die Altersstruktur der Studienkohorte zeigte eine für die Erkrankung typische Verteilung (Ripolone et al., 2017). Bei einem Alter von im Mittel 39 Jahren (8-73) zeigten die Patienten der Studie erstmals Symptome der Erkrankung (disease onset, Abb. 9). Zu diesem Parameter lagen Angaben von 33 Patienten vor. Die durchschnittliche Krankheitsdauer vom Beginn der ersten Symptome bis zum Biopsiezeitpunkt lag bei den 33 untersuchten Patienten bei 5 Jahren (0-26) (Abb. 9C).



**Abbildung 9: Alters- und Geschlechtsverteilung der untersuchten LOPD Patienten**

Die untersuchte Kohorte setzte sich zu 54,7% aus männlichen LOPD Patienten zusammen (A). Diese (n=29) waren zum Zeitpunkt der Biopsie nicht signifikant älter als die weiblichen Patientinnen (B) ( $p=0.38$ ). Im Mittel lagen zwischen Symptombeginn und Biopsieentnahme 5 Jahre (duration) (C) (n=33,  $p=0.06$ ).

## 4.2 Quantifizierung der Muskelpathologie

### 4.2.1 Muskelscore (Score), Glykogenakkumulation (PAS+%/MF), large empty vacuoles (LEV%/MF), autophagische Vakuolen (AV%/MF), Fibrose

An 53 Muskelbiopsien von LOPD Patienten wurde anhand der Flächenbestimmung von PAS+%/ Muskelfaser und LEV (large empty vacuoles) %/ Muskelfaser ein individueller Muskelscore erhoben sowie das Vorkommen von AV (autophagische Vakuolen) %/ Muskelfaser und ein Fibrosegrad bestimmt (Tabelle 8):

**Tabelle 8: Übersicht über die Ergebnisse der morphologischen Analyse der untersuchten LOPD Patienten**

	Score	PAS+%/MF	LEV %/MF	AV %/MF	Fibrose
P1	0.17	1.61	0.14	0	2
P2	3,77	44.62	10.09	18.43	2
P3	0.14	2.19	0	7.53	1
P4	0.13	0.24	0	1.35	1
P5	0.29	5.54	4.83	23.78	2
P6	0.59	8.72	0.89	27.93	1
P7	0.57	8.29	0	/	1
P8	1.97	36.38	0	8.69	3
P 9	0.63	6.54	0.01	0	1
P 10	0.8	4.73	0.42	7.09	1
P 11	0.51	2.35	0	0	1
P 12	0.38	1.76	0	0	0
P 13	1.71	25.45	1.54	8.73	2
P 14	1.57	14	9.22	4.91	2
P 15	0.52	8.63	0.06	2.49	1
P 16	1.02	7.04	0.48	0.45	1
P 17	0.23	4	0	0.75	1
P 18	0.07	0.77	0.01	0	0
P 19	1.12	18.68	0.69	0	1
P 20	2.91	38.11	0.97	0	3
P 21	1.89	9.34	0	5.13	1
P 22	0.13	1.65	0	0	1
P 23	1.84	13.64	2.87	2.76	2
P 24	0.34	4.66	0	/	1
P 25	0.39	4.48	0	/	2
P 26	0.48	4.59	0	0	1

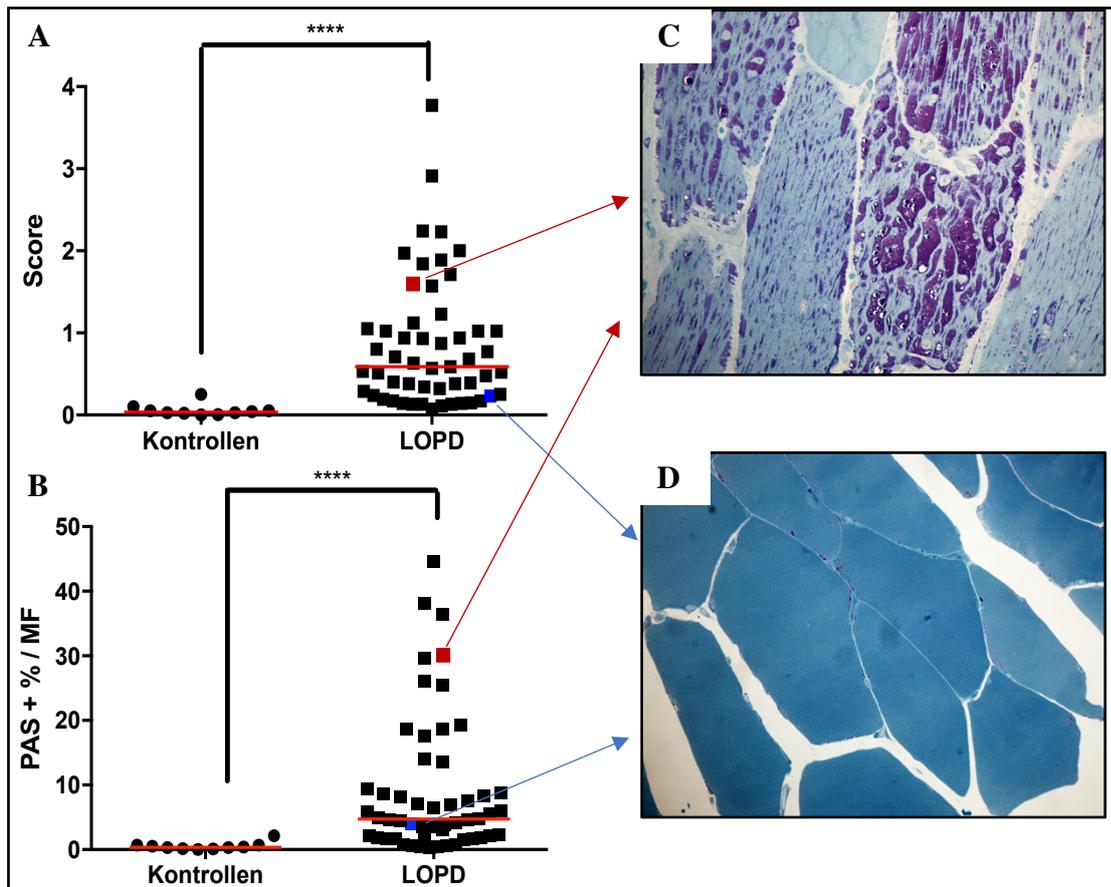
P 27	0.94	17.5	0.52	1.15	1
P 28	0.38	4.19	0.21	10.27	1
P 29	0.15	0.65	0.49	2.59	1
P 30	2.23	19.29	3.41	27.56	3
P 31	1.02	1.8	1.4	6.75	1
P 32	0.68	6.9	0.4	7.31	1
P 33	0.32	2.14	0	0.34	1
P 34	0.19	1.7	0	/	-
P 35	0.24	1.7	0.4	0	1
P 36	0.53	8.09	0.82	1.58	1
P 37	0.77	3.46	2.06	9.70	2
P 38	0.4	3.6	0.5	3.64	2
P 39	0.17	0.73	0.07	2.33	3
P 40	0.87	5.94	0.23	/	-
P 41	0.93	7.62	0.46	18.68	2
P 42	0.14	0.42	0	1.58	1
P 43	0.13	0.6	0	0	1
P 44	1.02	3.8	0	10.77	2
P 45	2.24	26	0	22.5	3
P 46	0.11	2.35	0	21.64	1
P 47	1.59	30.1	0.05	23.51	1
P 48	1.23	18.6	0.1	9.85	2
P 49	1.05	3.1	0	8.85	1
P 50	0.25	0.4	0	6.30	1
P 51	2	29.54	0.31	1.85	1
P 52	0.94	4.88	0	0	3
P 53	0.71	5.89	0	0	2

#### **4.2.2 Muskelscore (Score), Glykogenakkumulation (PAS+%/MF) bei Patienten mit LOPD im Vergleich zu Kontrollfällen**

Alle in der Studie untersuchten Muskelbiopsien sind vor dem Beginn einer Enzymersatztherapie (ERT) entnommen worden. Die morphometrischen Analysen wurden zusätzlich an 10 Kontrollpatienten durchgeführt. Die Kontrollgruppe bildeten 3 (30%) weibliche Patienten (Median 41 Jahre (30-73)) und 7 (70%) männliche Patienten (Median 52 Jahre (32-66)).

Bei den LOPD Patienten (n=53) zeigten sich im Vergleich zu Kontrollpatienten (n=10) signifikante histopathologische Veränderungen (Abb. 10). Es zeigten sich signifikante Unterschiede im Muskelscore (Score) (Kontrollen Median 0.04; LOPD Median 0.59,  $p < 0.0001$ ) und im Glykogengehalt (PAS+%/MF) (Kontrollen Median 0.35; LOPD Median 4.73,  $p < 0.0001$ ).

Der Muskelscore (Score) und der Glykogengehalt (PAS+%/MF) zeigten innerhalb der LOPD Patienten eine große Variabilität (Muskelscore Median 0.59 (0.07-3.77); Glykogengehalt Median 4.73 (0.24-44.62)). Diese große Variabilität der Histopathologie ist gut vereinbar mit bisher publizierten Daten (Schoser et al., 2007; Tsuburaya et al., 2012; Ripolone et al., 2017). Die Auswertungen zeigten, dass 75,5% (n=40) der LOPD Patienten  $< 10\%$  PAS+%/MF und 67,9% (n=36) einen Muskelscore  $< 1$  in den Muskelbiopsien aufwiesen. Im Vergleich zu infantilen Pompe Patienten (Schänzer, Kaiser et al. 2017) zeigten die LOPD Patienten damit deutlich geringere Glykogenablagerungen.



**Abbildung 10: Vergleich der Muskelpathologie zwischen LOPD Patienten und Kontrollpatienten**

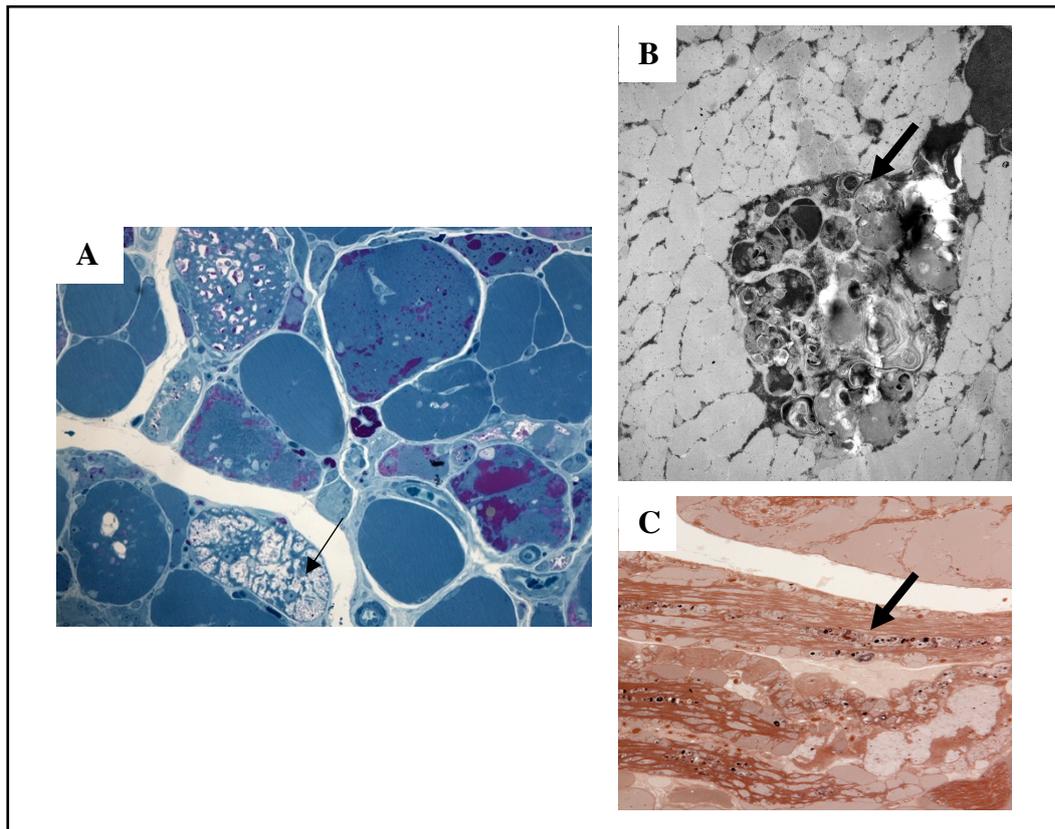
LOPD Patienten wiesen im Vergleich zu den Kontrollpatienten einen signifikant höheren Muskelscore ( $p < 0,0001$ ) (A) und signifikant mehr Glykogenablagerungen ( $p < 0,0001$ ) (B) auf. Die Muskelpathologie bei den LOPD Patienten zeigte eine starke Variabilität. PAS gefärbte Semidünnschnitte von zwei LOPD Patienten. LOPD mit hohem Muskelscore (C) (P 47, Score=1.59), LOPD mit geringem Muskelscore (D) (P 17, Score=0.23). Mann-Whitney Test, Vergrößerung x400.

### **Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse:**

- 1.** Die untersuchten LOPD Patienten zeigten im Vergleich zu Kontrollfällen signifikant ( $p < 0,0001$ ) höhere Werte im Muskelscore (Score) und im Glykogengehalt (PAS+%/MF).
- 2.** Der Ausprägungsgrad der Muskelpathologie der LOPD Patienten zeigte eine hohe Variabilität.
- 3.** Im Vergleich zu infantilen Pompe Patienten zeigte sich bei den LOPD Patienten eine geringere Muskelpathologie (>65% der LOPD Patienten zeigten bei einem Muskelscore <1 weniger als 10% PAS+%/MF).

### 4.2.3 Analyse der Vakuolen (LEV%/MF, AV%/MF)

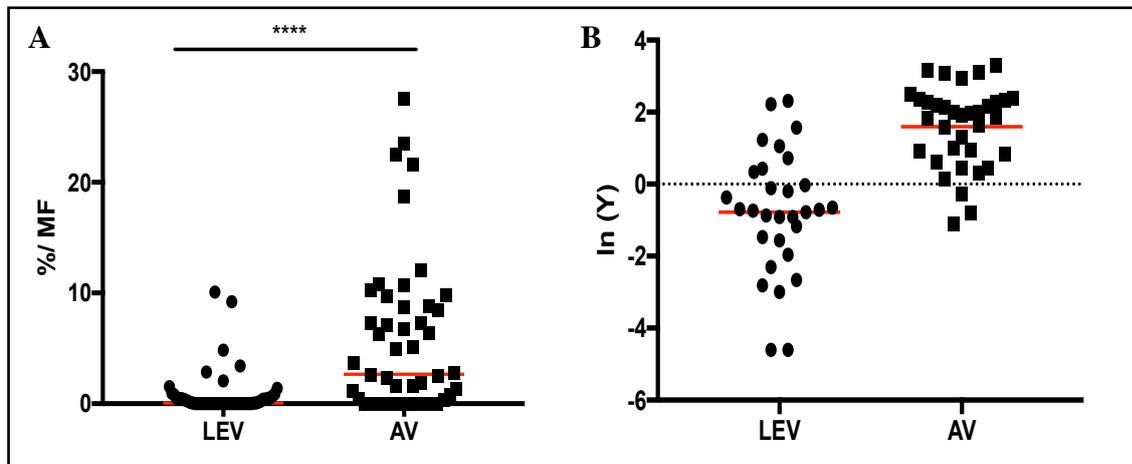
Ein Ziel in dieser Studie war es das Ausmaß der Autophagie zu erfassen. Daher wurde in den Muskelbiopsien das Vorkommen von large empty vacuoles (LEV) und autophagischen Vakuolen (AV) untersucht. Es zeigte sich, dass bei verstärkter Muskelpathologie das Vorkommen von LEV sowie von AV erhöht war (Abb.11).



**Abbildung 11: LEV und AV bei LOPD Patienten**

Darstellung von Muskelfasern mit LEV (large empty vacuoles, dünner Pfeil) in SD- PAS Schnitten (P 14, LEV%/MF 9.22) (A) und mit AV (autophagische Vakuolen, dicke Pfeile) im EM-Präparat (P 2, AV %/MF 18.43 ) (B) sowie an SD-PPD Schnitten (P2) (C), Vergrößerung SD x400, Vergrößerung EM x4.400.

Es zeigte sich, dass die Muskelbiopsien der LOPD Patienten signifikant mehr autophagische Vakuolen (n=48 Median 2,67 (0-27.56)) als LEV (n=53 Median 0.06 (0-10.09)) aufwiesen ( $p < 0.0001$ , Abb. 12).



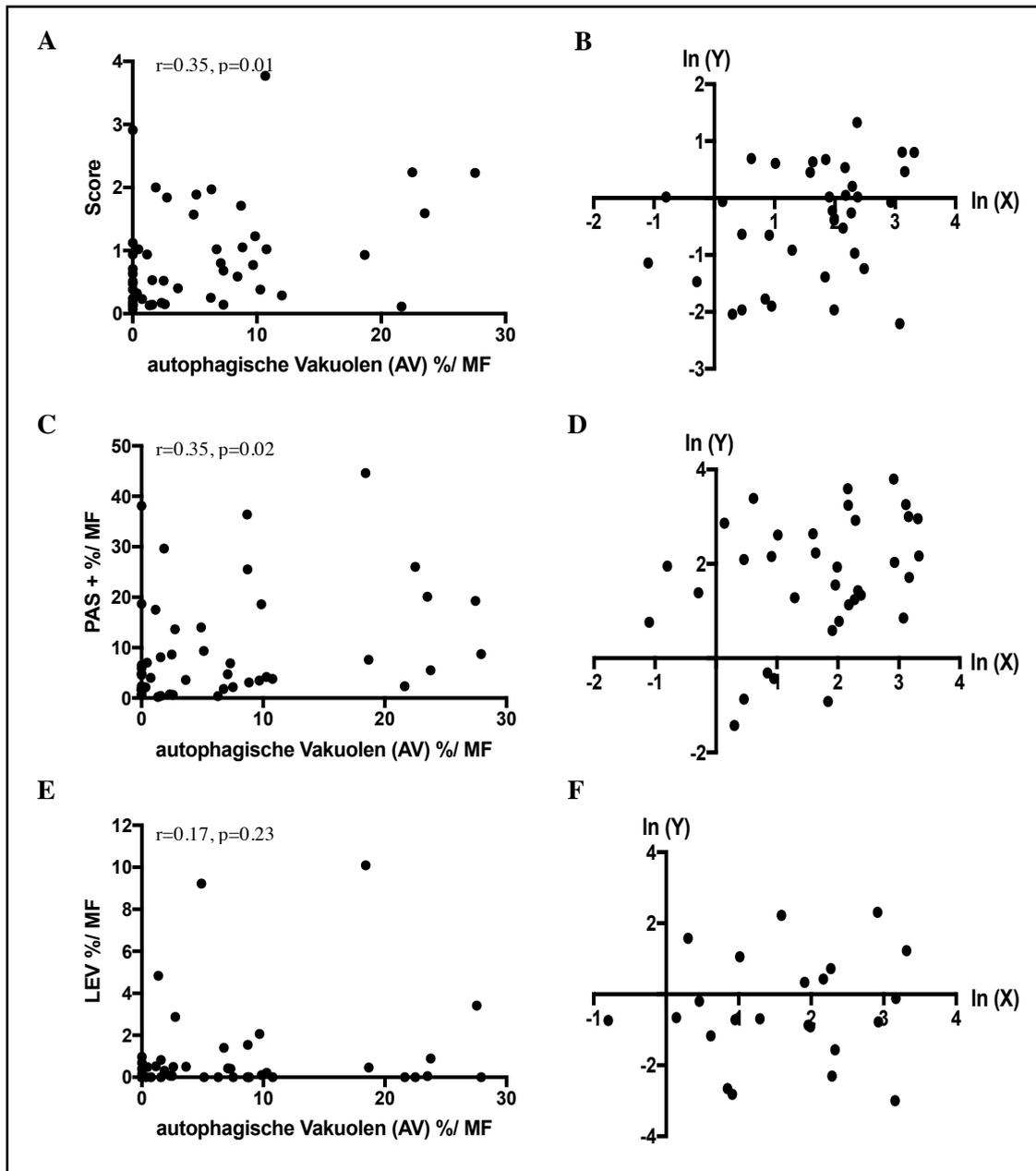
**Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung von LEV und AV bei LOPD Patienten**

Die LOPD Patienten zeigten signifikant mehr autophagische Vakuolen (AV) als large empty vacuoles (LEV) ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney Test). Einfache (A) sowie logarithmierte Darstellung (B).

#### 4.2.4 Muskelscore (Score), Glykogenakkumulation (PAS+%/MF) und large empty vacuoles (LEV%/MF) unter Berücksichtigung der autophagischen Vakuolen (AV%/MF)

Es wurde untersucht, ob die Höhe der autophagischen Vakuolen mit dem Ausprägungsgrad der Muskelpathologie korreliert (Spearman-Korrelation).

Die Analyse (n=48) ergab einen positiven linearen Zusammenhang zwischen der Höhe der autophagischen Vakuolen und dem Ausprägungsgrad der Muskelpathologie (Score, Glykogenakkumulation) ((Abb. 13 A, C)  $r = 0.35$ ). Zwischen der Höhe der LEV und den autophagischen Vakuolen zeigte sich keine signifikante Korrelation ((Abb. 13 E, F)  $r = 0.17$ ).

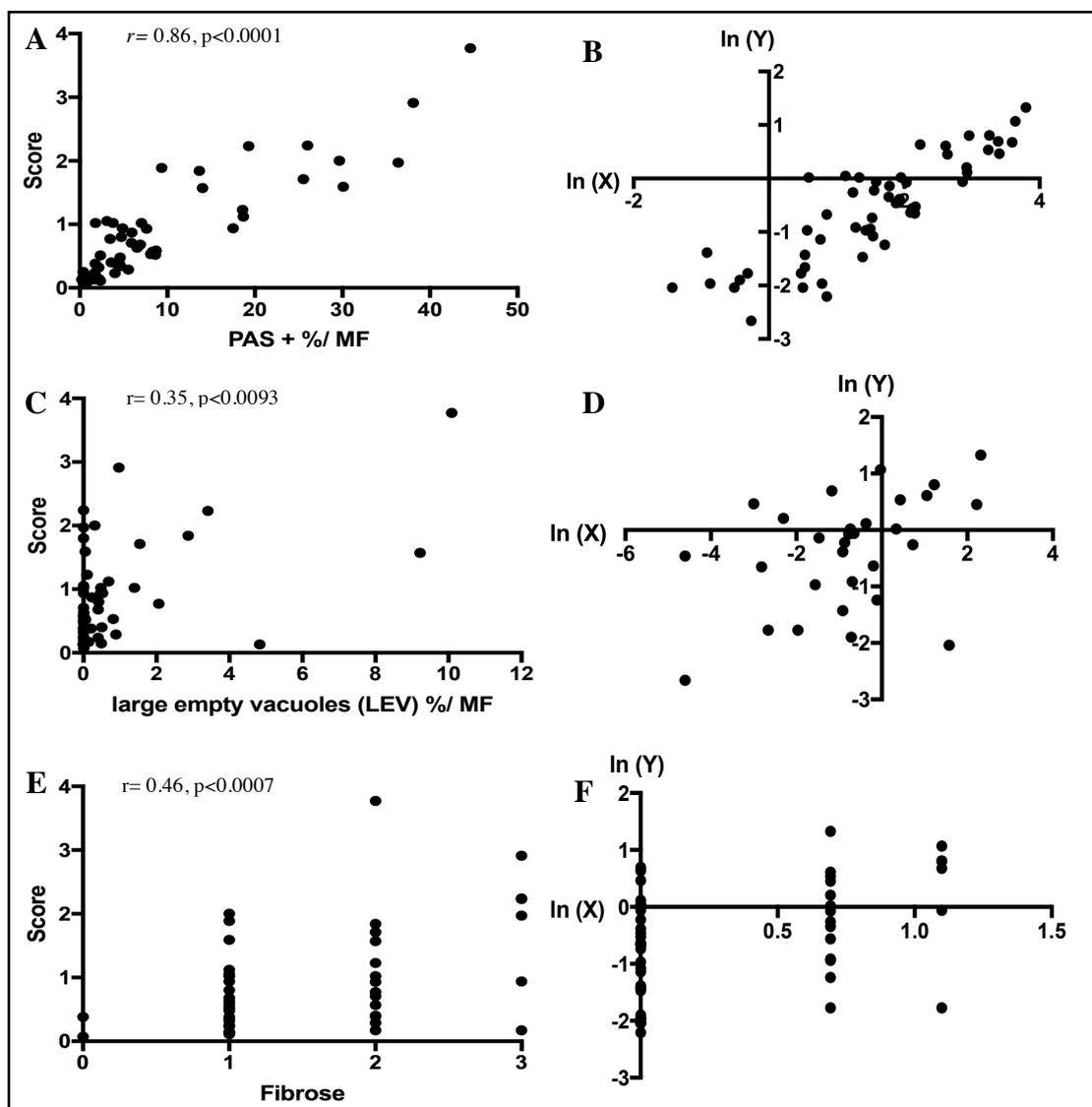


**Abbildung 13: Abhängigkeit der Muskelpathologie von den autophagischen Vakuolen in logarithmierter (A, C, E) und entlogarithmierter Darstellung (B, D, F)**

Die Anzahl der autophagischen Vakuolen der LOPD Patienten zeigte eine signifikante Korrelation mit dem Muskelscore ((A,B  $r=0.35, p=0.01$ )) sowie den Glykogenablagerungen (C,D  $r=0.35, p=0.02$ )), jedoch nicht mit den leeren großen Vakuolen (LEV) (E,F  $r=0.17, p=0.23$ ), Spearman-Korrelation.

#### 4.2.5 Korrelationsanalyse des Muskelscores (Score) unter Berücksichtigung weiterer morphologischer Parameter (Glykogenakkumulation (PAS+%/MF), large empty vacuoles (LEV%/MF), Fibrose)

Die anhand der Muskelbiopsien untersuchten Parameter (Glykogenakkumulation, LEV, AV, Fibrose) bilden wesentliche Merkmale der Histopathologie bei LOPD Patienten ab (Ripolone et al., 2017; Lewandowska et al., 2008; Schoser et al., 2007). Nachfolgend wurde das Verhalten dieser Parameter zueinander statistisch untersucht. Es zeigte sich, dass mit der Höhe des Muskelscores auch der Ausprägungsgrad der anderen untersuchten myopathologischen Parameter anstieg (Abb. 14):



**Abbildung 14: Korrelationsanalyse des Muskelscores mit anderen morphologischen Parametern in logarithmierter (A, C, E) und entlogarithmierter Darstellung (B, D, F)**

LOPD Patienten zeigten bei ansteigendem Muskelscore höhere Glykogenablagerungen im Muskelgewebe (A,B  $r=0.86$ ,  $p<0.0001$ ), eine höhere Anzahl an LEV (C,D  $r=0.35$ ,  $p<0.0093$ ) und einen signifikant höheren Grad der Fibrose (E,F  $r=0.46$ ,  $p<0.0007$ ), Spearman-Korrelation.

Die Analysen der morphometrisch erhobenen myopathologischen Parameter zeigten signifikant positive Korrelationen zueinander. Die autophagischen Vakuolen (AV) und die large empty vacuoles (LEV) zeigten untereinander jedoch keine signifikant positive Korrelation (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Zusammenfassung der morphologischen Parameter der untersuchten LOPD Patienten**

	<b>Morphologie</b>	<b>Anzahl (n)</b>	<b>Median (-/+)</b>	<b>Korrelation (r)</b>	<b>Signifikanz (p)</b>
<b>Score</b>	PAS+%/MF	53	4.73 (0.24-44.62)	0.86	<0.0001 (****)
	LEV%/MF	53	0.06 (0-10.09)	0.35	0.01 (**)
	AV%/MF	48	2.68 (0-27.56)	0.35	0.01 (*)
<b>PAS+%/MF</b>	Score	53	0.59 (0.07-3.77)	0.86	<0.0001 (****)
	LEV%/MF	53	0.06 (0-10.09)	0.31	0.02 (*)
	AV%/MF	48	2.68 (0-27.93)	0.35	0.02 (*)
<b>LEV%/MF</b>	Score	53	0.59 (0.07-3.77)	0.35	0.01 (**)
	PAS+%/MF	53	4.73 (0.24-44.62)	0.31	0.02 (*)
	AV%/MF	48	2.68 (0-27.93)	0.18	0.23 (ns)
<b>AV%/MF</b>	Score	48	0.66 (0.07-3.77)	0.35	0.01 (*)
	PAS +%/MF	48	4.81 (0.24-44.62)	0.35	0.02 (*)
	LEV%/MF	48	0.09 (0-10.09)	0.18	0.23 (ns)

## **Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse:**

- 1.** Die untersuchte Studienkohorte rekrutierte sich aus 29 männlichen sowie 24 weiblichen Patienten und repräsentierte bei einem medianen Alter bei Biopsie von 39 Jahren eine typische Verteilung bei LOPD Patienten.
- 2.** Bei den untersuchten LOPD Patienten nahm mit zunehmendem Muskelscore die Glykogenakkumulation signifikant zu.
- 3.** Bei den untersuchten LOPD Patienten nahm mit zunehmendem Muskelscore das Auftreten von leeren großen Vakuolen (LEV) signifikant zu.
- 4.** Bei den untersuchten LOPD Patienten zeigte sich mit zunehmendem Muskelscore ein signifikant erhöhtes Vorkommen von autophagischen Vakuolen.
- 5.** Bei den untersuchten LOPD Patienten nahm mit zunehmendem Muskelscore der Fibrosegrad signifikant zu.

### **4.3 Fallbeispiele**

Die ausgeprägte Variabilität der Muskelpathologie der LOPD Patienten wird nachfolgend an 2 Patienten exemplarisch dargestellt. Insbesondere zeigt sich eine variable lysosomale sowie extra-lysosomale Glykogenablagerung im Muskelfasergewebe (Fallbeispiel 1, Abb. 15). Interessant ist, dass LOPD Patienten noch vor dem Auftreten von ausgeprägter pathologischer Glykogenakkumulation zahlreiche autophagische Vakuolen aufweisen können (Fallbeispiel 2, Abb. 16).

## Fallbeispiel 1:

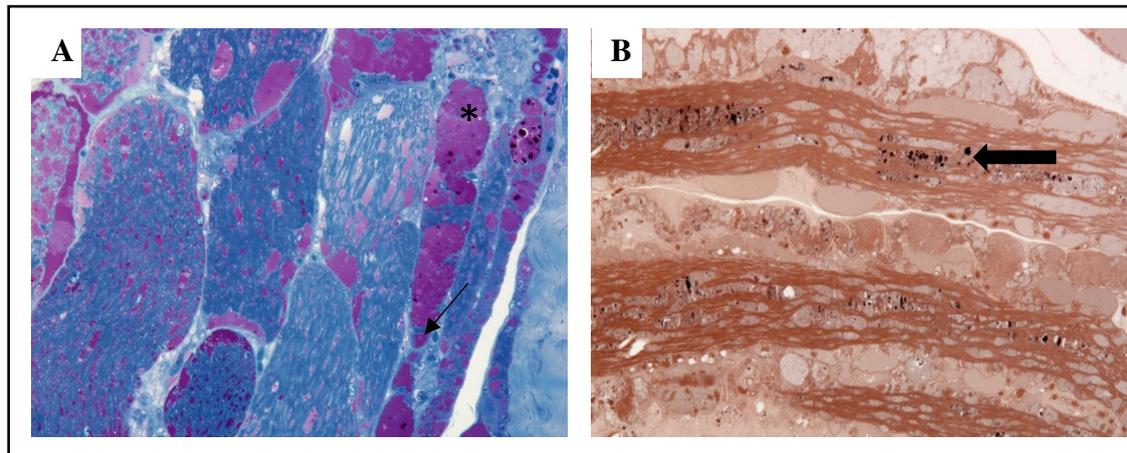


Abbildung 15: Fallbeispiel 1, P 2

LOPD Patient (P2) mit hohem Muskelscore bei ausgeprägter Muskelpathologie. Schädigung der Muskulatur (M. quadriceps femoris) durch Glykogenakkumulation (\*) mit begleitender Kalibervariation (dünner Pfeil) sowie bindegewebigem Umbau in der PAS-Färbung (A). Zahlreiche autophagische Vakuolen (dicker Pfeil) kommen in der PAS-Färbung zur Darstellung (B).

### Morphologische Parameter:

Score	3.77
PAS+%/MF	44.62
LEV %/MF	10.09
Autophagische Vakuolen	6.98 %
Endomysiale Fibrose	2

### Klinische Parameter:

Geschlecht	männlich
Beginn der Symptome	11.LJ
Alter bei Biopsie	19 LJ
Krankheitsdauer	8J
Biopsie	M. quadriceps femoris
Muskuläre Symptome	prox. Muskelschwäche der Beine und Arme
CK bei Biopsie	860 U/l
Mutation	k.A.

## Fallbeispiel 2:

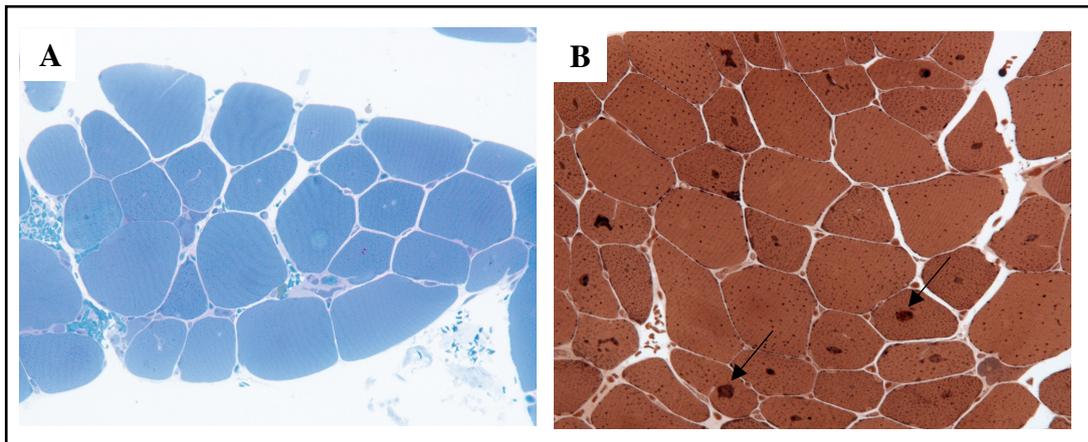


Abbildung 16: Fallbeispiel 2, P 24

LOPD Patient (P24) mit niedrigem Muskelscore und diskreter Muskelpathologie (M. vastus lateralis) bei allenfalls gering ausgeprägter Glykogenspeicherung sowie geringer endomysialer Fibrose in der PAS-Färbung (A). Demgegenüber zeigt sich eine deutliche Anfärbung autophagischer Vakuolen in der PPD-Färbung (B, Pfeile).

### Morphologische Parameter:

Score	0.34
PAS+%/MF	4.66
LEV %/MF	0
Autophagische Vakuolen	7.52%
Endomysiale Fibrose	1

### Klinische Parameter:

Geschlecht	weiblich
Beginn der Symptome	20.LJ
Alter bei Biopsie	25J
Krankheitsdauer	6J
Biopsie	M. vastus lateralis
Muskuläre Symptome	prox. Muskelschwäche der Beine und Arme
CK bei Biopsie	645 U/l
Mutation	Homozygote Mutation: c.-32-13T>G und c.525delT

## 4.4 Korrelation der Muskelpathologie mit klinischen Parametern

### 4.4.1 Muskelscore (Score), Glykogenakkumulation (PAS+%/MF) unter Berücksichtigung des Alters der Patienten bei Biopsie

Die Analyse der Muskelpathologie hinsichtlich des Alters der Patienten bei Biopsie zeigte, dass die meisten (56,6 %) Patienten (n=30) bei Biopsie zwischen 30 und 50 Jahre alt waren. 80% der Patienten (n=24) in dieser Altersgruppe wiesen weniger als 10% Glykogen/Muskelfläche und 76,6% (n=23) einen Score < 1 auf (Abb. 17). Untersucht wurde ebenfalls, ob zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme jüngere Patienten eine signifikant höhere Muskelpathologie zeigen.

Es ließen sich jedoch zwischen den Altersgruppen (<30J (n=9), 30-50J (n=30), >50J (n=14)) keine signifikanten Unterschiede in der Muskelpathologie dokumentieren (Abb. 17 (A) Score: n=53, p=0.19; (B) Glykogenakkumulation: n=53, p=0.11).

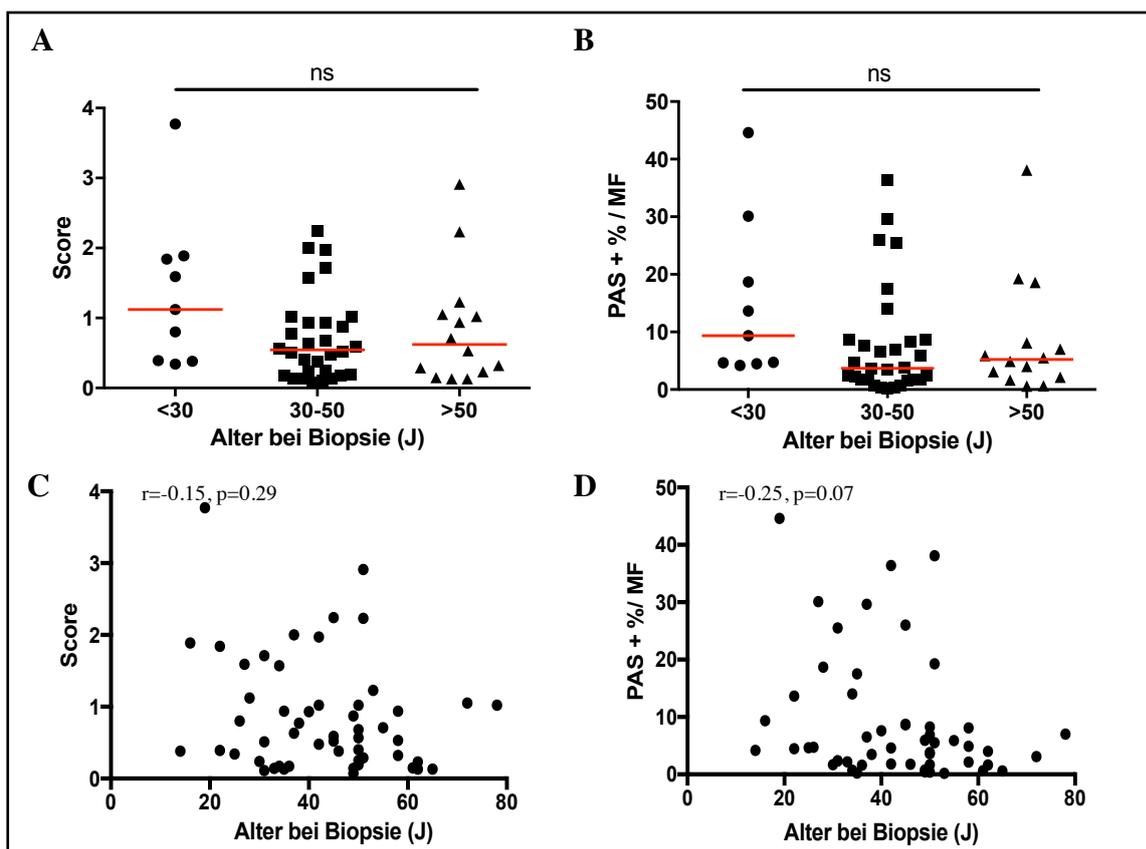


Abbildung 17: Abhängigkeit der Muskelpathologie vom Alter bei Biopsie

Die jüngste Patientengruppe (<30 Jahre bei Biopsie) wies in Gruppenanalysen (Kruskal-Wallis-Test) keinen signifikant höheren Muskelscore (A) (p=0.19) und keine signifikant höheren Glykogenablagerungen (B) (p=0.11) als ältere Patientengruppen auf. Diese Ergebnisse zeigten sich ebenfalls in den Korrelationsanalysen (Spearman-Korrelation) zweier Variablen ((C) Score/Alter bei Biopsie  $r=-0.15$ ,  $p=0.29$ ; (D) PAS%/MF/Alter bei Biopsie  $r=-0.25$ ,  $p=0.07$ ).

#### 4.4.2 Muskelscore (Score), Glykogenakkumulation (PAS+%/MF) und large empty vacuoles (LEV%/MF) unter Berücksichtigung des Alters bei Symptombeginn (disease onset)

Von 33 LOPD Patienten lagen klinische Angaben zum Alter bei Symptombeginn (disease onset) vor. Patienten mit einem frühen Symptombeginn hatten keine signifikant höhere Muskelpathologie als Patienten mit höherem Alter bei Symptombeginn (Score  $p=0.08$ ; PAS+%/MF  $p=0.12$ ; LEV  $p=0.39$ ) (Abb. 18).

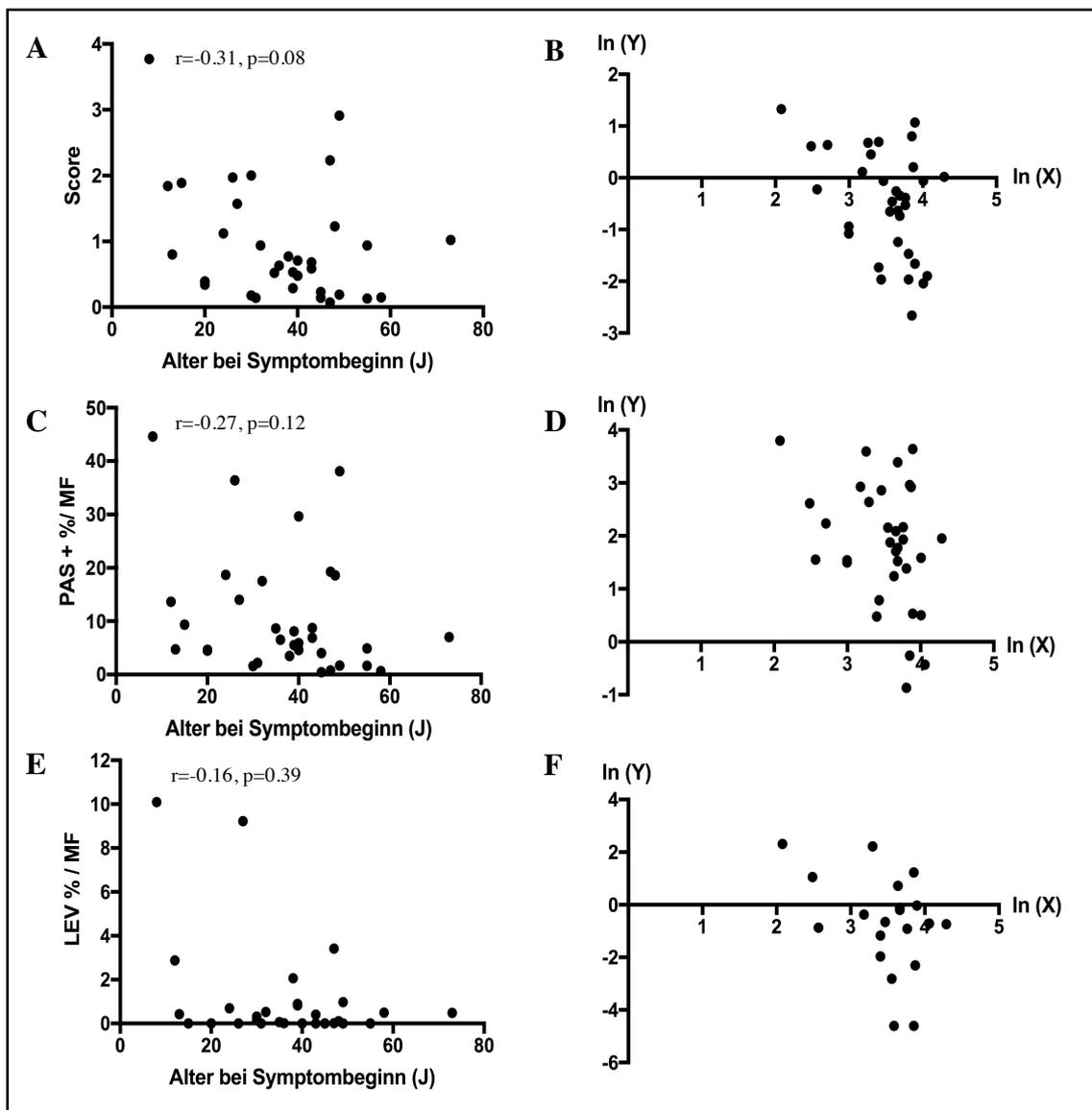
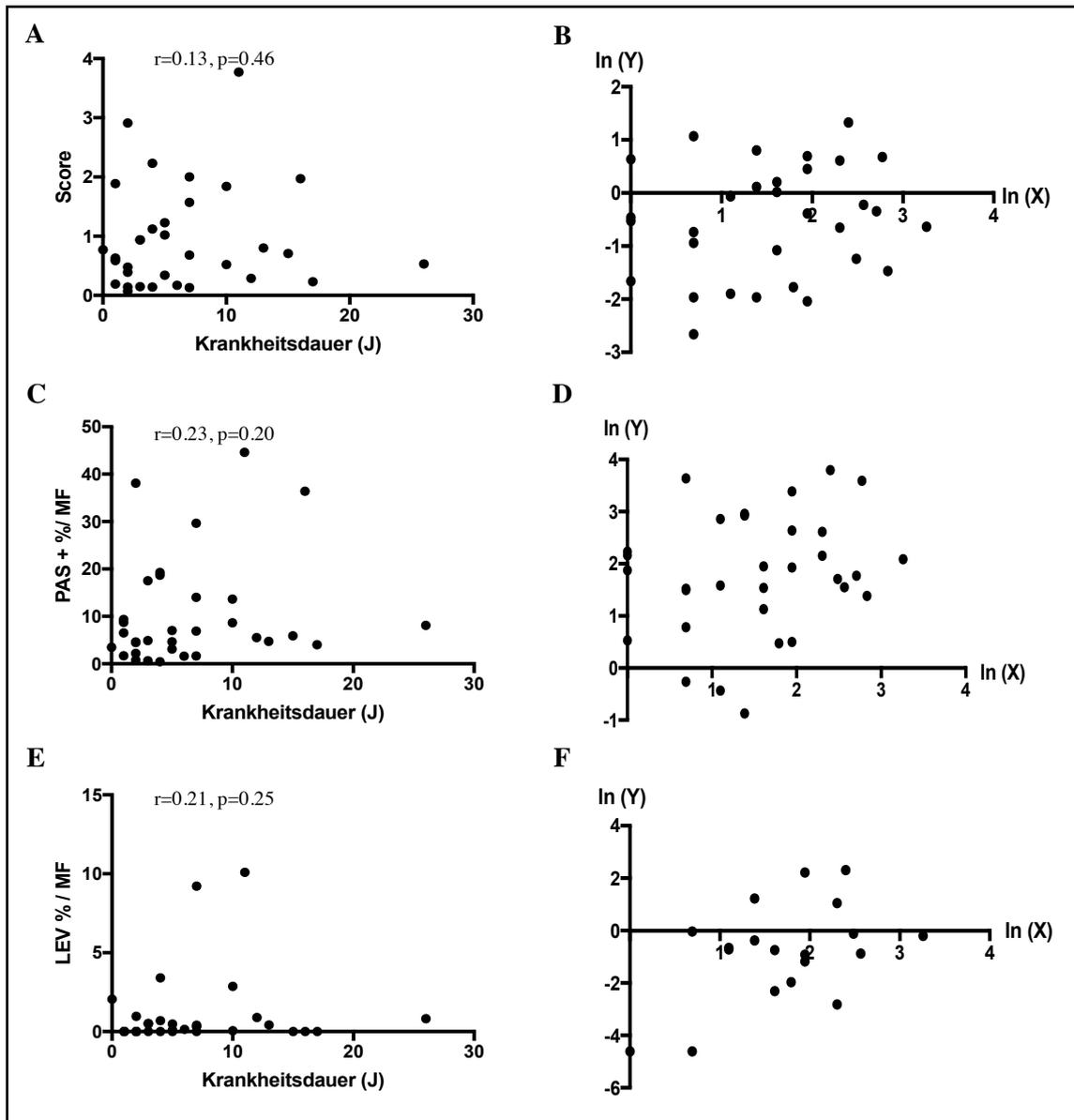


Abbildung 18: Abhängigkeit der Muskelpathologie vom Alter bei Symptombeginn

Das Alter der LOPD Patienten bei Auftreten erster Symptome zeigte keine signifikante Korrelation mit dem Muskelscore ((A,B)  $p=0.08$ ), den Glykogenablagerungen ((C,D)  $p=0.12$ ) sowie den leeren großen Vakuolen (LEV) ((E,F)  $p=0.39$ , Spearman-Korrelation).

#### **4.4.3 Muskelscore (Score), Glykogenakkumulation (PAS+%/MF) und large empty vacuoles (LEV%/MF) unter Berücksichtigung der Krankheitsdauer in Jahren (duration)**

Die Muskelbiopsien sind zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt im Krankheitsverlauf der Patienten entnommen worden. Die bis zu diesem Zeitpunkt vergangene Krankheitsdauer (duration) ist bei den untersuchten Patienten individuell verschieden (n=33, Median 5 (0-26)). Von 33 LOPD Patienten lagen klinische Angaben zur individuellen Krankheitsdauer (duration) vor. Es zeigte sich, dass Patienten mit einer langen Krankheitsdauer keine statistisch signifikant höhere Muskelpathologie aufwiesen als Patienten mit einer kürzeren Krankheitsdauer (Score (A,B) p=0.46, PAS+%/MF (C,D) p=0.20, LEV%/MF (E,F) p=0.25) (Abb. 19).



**Abbildung 19: Abhängigkeit der Muskelpathologie von der individuellen Krankheitsdauer vor Muskelbiopsie**

Die individuelle Krankheitsdauer (duration) der LOPD Patienten zeigte keine signifikante Korrelation mit dem Muskelscore ((A,B)  $p=0.46$ ), den Glykogenablagerungen ((C,D)  $p=0.20$ ) sowie den leeren großen Vakuolen ((E,F)  $p=0.25$ ), Spearman-Korrelation.



#### 4.4.4 Muskelscore (Score), Glykogenakkumulation (PAS+%/MF) unter Berücksichtigung der Restenzymaktivität

Die GAA-Restenzymaktivität (REA) der alpha-1,4-Glucosidase wurde bei den Patienten der Kohorte zum Teil im Muskelgewebe bzw. im Trockenbluttest (DBS) bestimmt. Die erhobenen Daten (n=26) wurden im Verlauf normiert und sind jeweils in Prozentangaben vom jeweiligen Sollwert angegeben. Bei den 26 Patienten zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der GAA-Restenzymaktivität und der Muskelpathologie (Score (A, B)  $p=0.65$ , Glykogenakkumulation (C, D)  $p=0.84$ ) (Abb. 21).

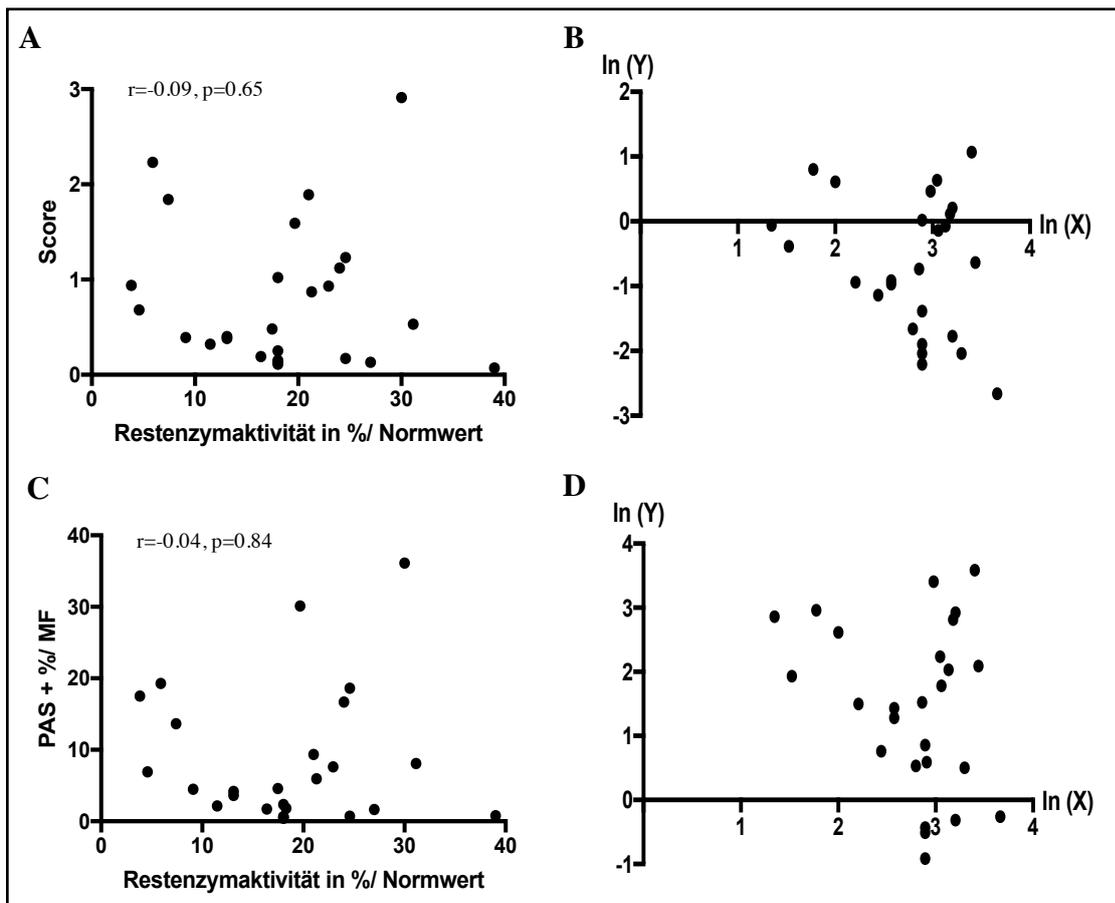
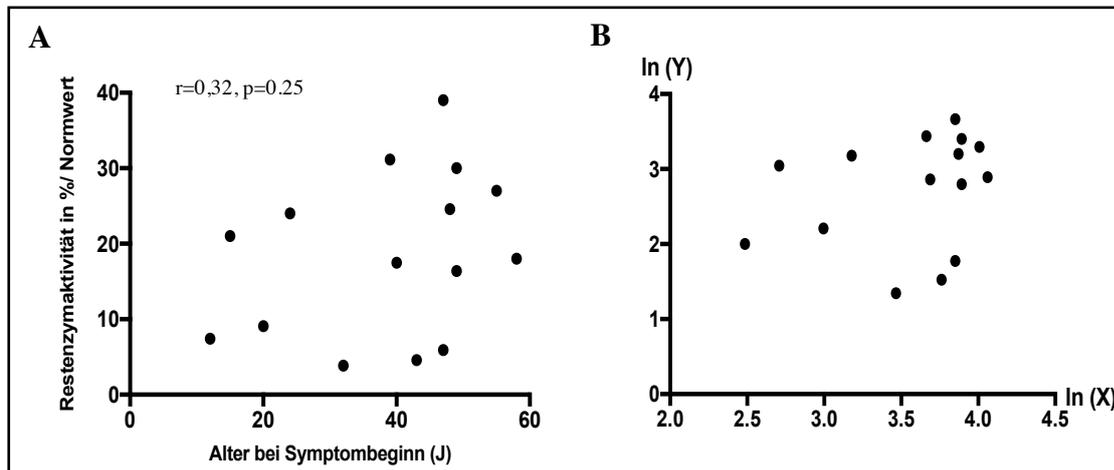


Abbildung 21: Abhängigkeit der Muskelpathologie von der GAA-Restenzymaktivität (REA)

Die GAA-Restenzymaktivität der LOPD Patienten zeigte keine signifikante Korrelation mit dem Muskelscore ((A, B)  $p=0.65$ ) und den Glykogenablagerungen ((C, D)  $p=0.84$ ), Spearman-Korrelation.

Bei 15 LOPD Patienten lagen zum Zeitpunkt der Studie Angaben zum Alter bei Symptombeginn (disease onset) sowie zur GAA-Restenzymaktivität (REA) vor. Eine Analyse dieser Daten ergab, dass Patienten mit frühem Symptombeginn keine signifikant stärker reduzierte GAA-Restenzymaktivität aufwiesen ( $p=0.25$ , Spearman-Korrelation) (Abb. 22).

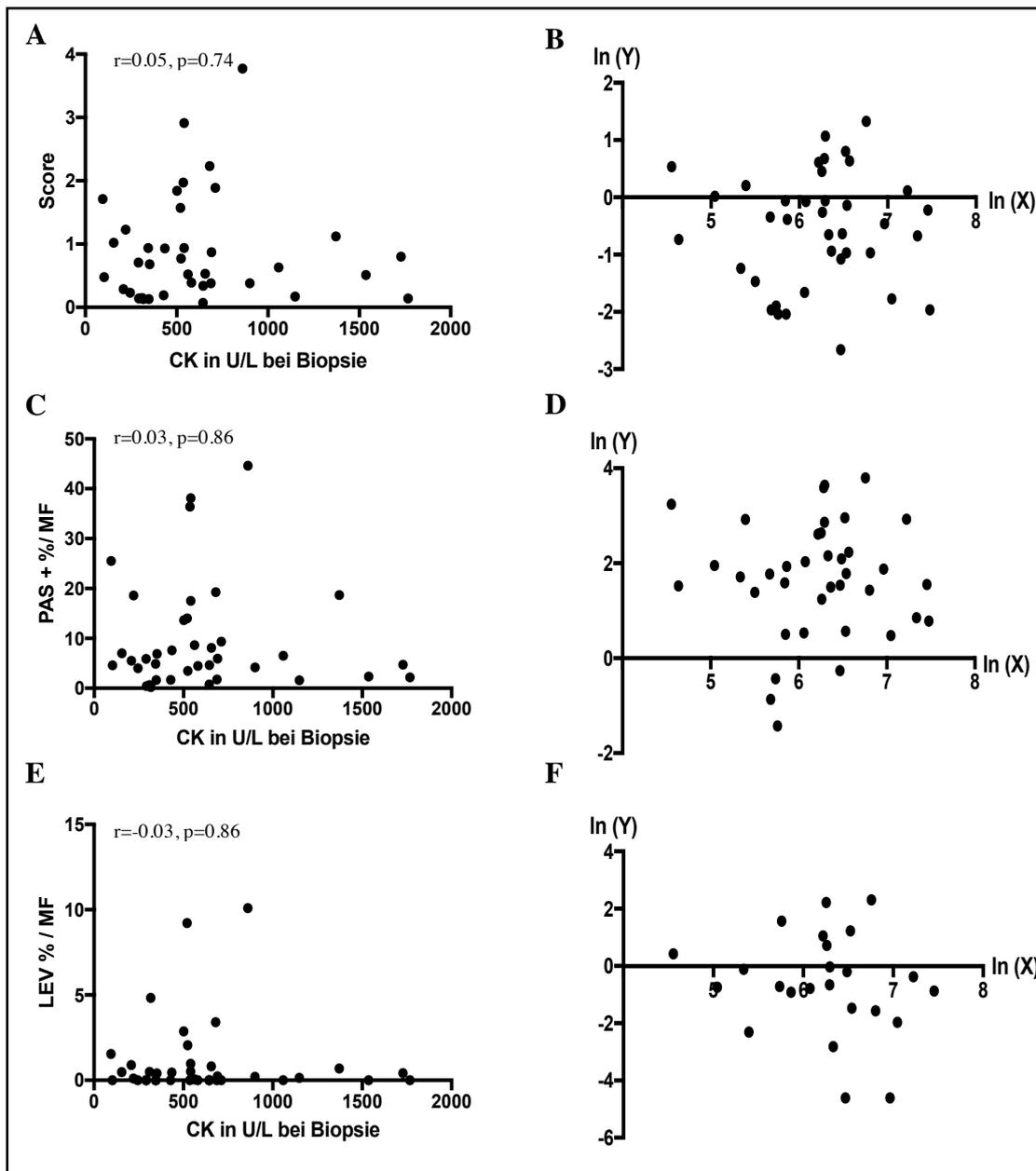


**Abbildung 22: Abhängigkeit des Alters bei Symptombeginn von der GAA-Restenzymaktivität**

Die Restenzymaktivität der LOPD Patienten zeigte keine signifikante Korrelation mit dem Alter bei Symptombeginn ((A, B)  $p=0.25$ ), Spearman-Korrelation.

#### 4.4.5 Muskelscore (Score), Glykogenakkumulation (PAS+%/MF) und large empty vacuoles (LEV%/MF) unter Berücksichtigung der Creatinkinase (CK)

Die LOPD Patienten zeigen häufig erhöhte Creatinkinase (CK)-Werte im Serum. Eine signifikante Abhängigkeit dieses Parameters vom Ausprägungsgrad der Muskelpathologie ist denkbar. Eine Analyse der Daten von 38 LOPD Patienten zeigte, dass Patienten mit einer hohen Creatinkinase keine statistisch signifikant höhere Muskelpathologie aufwiesen als Patienten mit, zum Biopsiezeitpunkt gemessenen, niedrigeren Creatinkinase-Werten (Score ( $p=0.74$ ), Glykogenakkumulation ( $p=0.86$ ), LEV ( $p=0.86$ )) (Abb. 23), Spearman-Korrelation.



**Abbildung 23: Abhängigkeit der Muskelpathologie von der Creatinkinase (CK)**

Die Creatinkinase der LOPD Patienten zeigte keine signifikante Korrelation mit dem Muskelscore ((A,B)  $p=0.74$ ), den Glykogenablagerungen ((C,D)  $p=0.86$ ) sowie den leeren großen Vakuolen (LEV) ((E,F)  $p=0.86$ ), Spearman-Korrelation.

#### 4.4.6 Korrelation der autophagischen Vakuolen (AV%/MF) und large empty vacuoles (LEV%/MF) mit dem klinischen Phänotyp

##### 4.4.6.1 Autophagische Vakuolen (AV) und large empty vacuoles (LEV) unter Berücksichtigung des Alters bei Biopsie

Es ist untersucht worden, inwiefern das Alter bei Biopsie mit der Höhe der autophagischen Vakuolen (AV) bzw. large empty vacuoles (LEV) korreliert. Die Analyse ergab, dass zum Biopsiezeitpunkt ältere Patienten nicht signifikant mehr autophagische Vakuolen ( $n=47$ ,  $p=0,22$ , Median 2.76 (0-27.93)) oder large empty vacuoles ( $n=53$ ,  $p=0,32$ , Median 0.06 (0-10.09)) aufwiesen als jüngere Patienten (Abb. 24, Spearman-Korrelation).

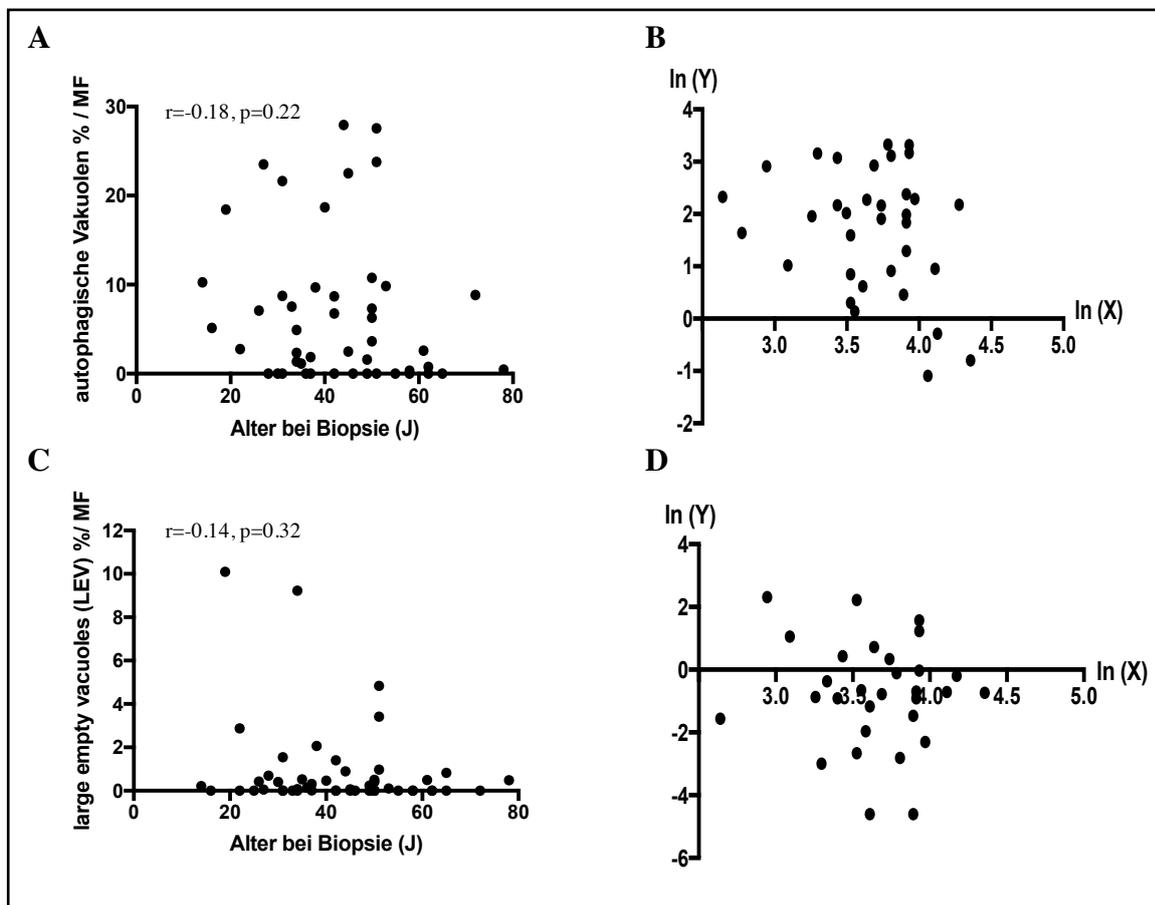
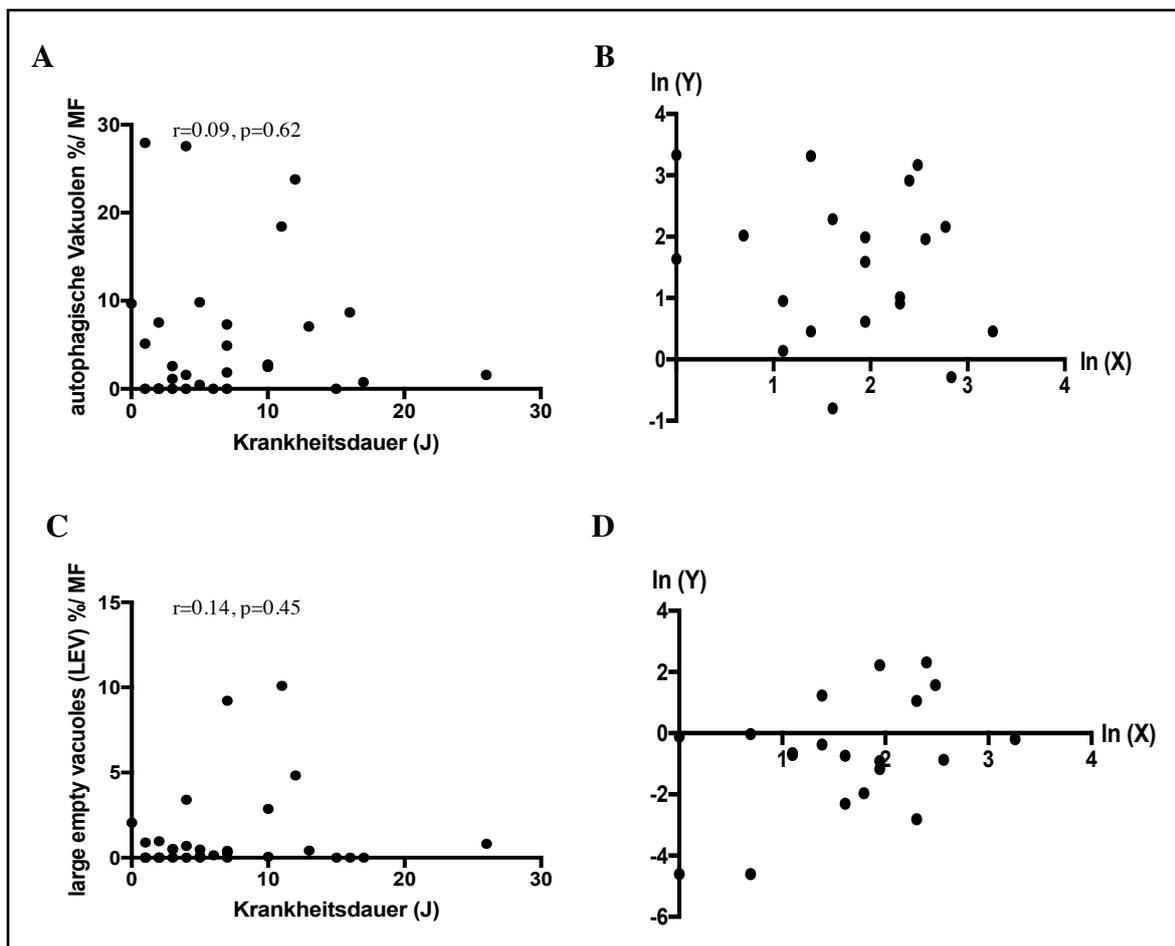


Abbildung 24: Abhängigkeit der autophagischen Vakuolen (AV) und large empty vacuoles (LEV) vom Alter bei Biopsie

Der Ausprägungsgrad der autophagischen Vakuolen (AV) ( $p=0,22$ ) bzw. large empty vacuoles (LEV) ( $p=0,32$ ) bei den LOPD Patienten zeigte keine signifikante Korrelation mit dem Alter bei Biopsie, Spearman-Korrelation.

#### 4.4.6.2 Autophagische Vakuolen (AV%/MF) und large empty vacuoles (LEV%/MF) unter Berücksichtigung der Krankheitsdauer vor Biopsie (duration)

Es wurde untersucht, inwiefern die Länge der Krankheitsdauer vor Biopsie (duration) Einfluss auf die Anzahl an autophagischen Vakuolen (AV) bzw. an large empty vacuoles (LEV) hat. Eine Analyse ergab, dass bei Biopsie ältere Patienten nicht signifikant mehr autophagische Vakuolen ( $n=30$ ,  $p=0.62$ , Median 2.17 (0-27.93)) oder large empty vacuoles ( $n=33$ ,  $p=0.45$ , Median 0.14 (0-10.09)) aufwiesen als jüngere Patienten (Abb. 25, Spearman-Korrelation).



**Abbildung 25: Abhängigkeit der autophagischen Vakuolen (AV) und large empty vacuoles (LEV) von der Krankheitsdauer vor Biopsie (duration)**

Die Anzahl an autophagischen Vakuolen (AV) ( $p=0.62$ ) bzw. large empty vacuoles (LEV) ( $p=0.45$ ) bei den LOPD Patienten zeigte keine signifikante Korrelation mit der jeweiligen Krankheitsdauer vor Biopsie, Spearman-Korrelation.

## **Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse:**

- 1.** Es zeigte sich bei 53 untersuchten LOPD Patienten keine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der Muskelpathologie und dem Alter zum Biopsiezeitpunkt. Die meisten LOPD Patienten (n=30, 56,6%) waren zum Zeitpunkt der Biopsie zwischen 30 und 50 Jahre alt.
- 2.** Es zeigte sich bei 33 untersuchten LOPD Patienten keine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der Muskelpathologie und dem Alter bei Symptombeginn (disease onset) bzw. der individuellen Krankheitsdauer (duration). Im Median lag bei den meisten LOPD Patienten die Krankheitsdauer unter 5 Jahren.
- 3.** Es zeigte sich bei 26 untersuchten LOPD Patienten keine signifikante Korrelation zwischen der zum Biopsiezeitpunkt laborchemisch bestimmten GAA-Restenzymaktivität und der Höhe der Muskelpathologie (Muskelscore, Glykogenakkumulation) (Abb.21). Auch das Alter bei Symptombeginn (disease onset) zeigte in der Studie keinen signifikanten Einfluss auf die GAA-Restenzymaktivität.
- 4.** Es zeigte sich bei 38 untersuchten LOPD Patienten keine signifikante Korrelation zwischen der zum Biopsiezeitpunkt laborchemisch bestimmten Creatinkinase (CK) und der Höhe der Muskelpathologie (Muskelscore, Glykogenakkumulation).
- 5.** Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad der autophagischen Vakuolen bzw. der large empty vacuoles (LEV) und dem Alter zum Biopsiezeitpunkt.
- 6.** Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad der autophagischen Vakuolen bzw. der large empty vacuoles (LEV) und der individuellen Krankheitsdauer (duration).

## **4.5 Genetik - Korrelationsanalyse des myopathologischen Phänotyps mit dem Genotyp der LOPD Patienten**

In den folgenden Analysen wurden die Muskelpathologie der LOPD Patienten sowie deren klinische Parameter mit dem GAA-Genotyp untersucht. Hierbei sollte insbesondere die Frage beantwortet werden, ob eine Aussage über den Ausprägungsgrad der Muskelpathologie und damit über den Grad der Myopathie anhand der Mutationen im GAA-Gen (Genotyp) getroffen werden kann.

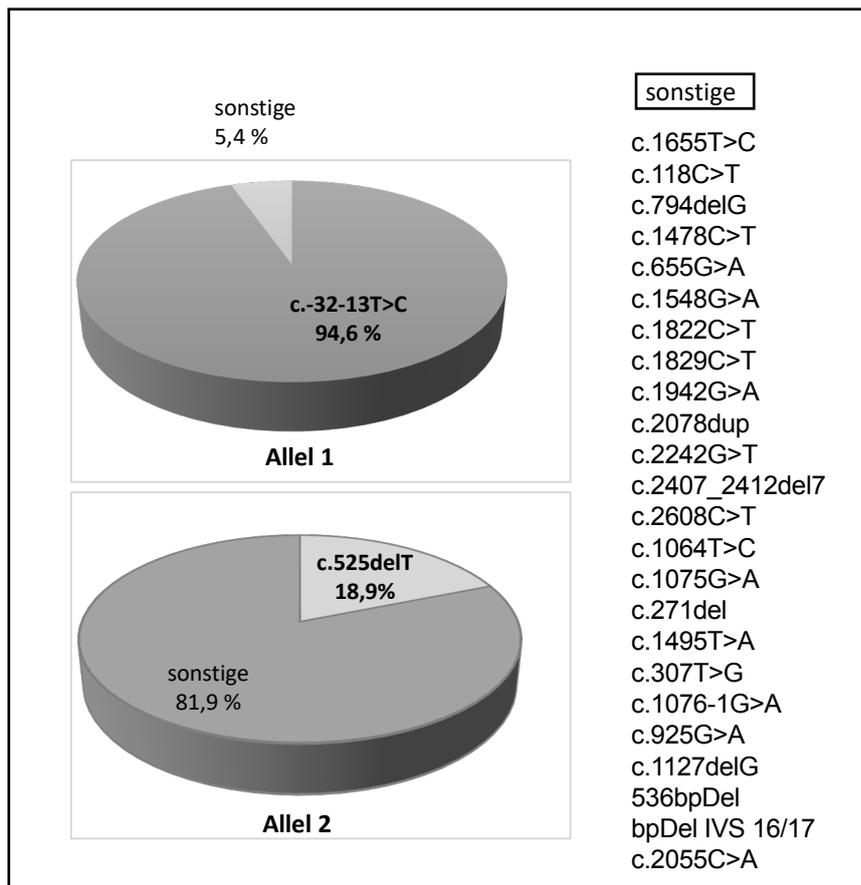
### **4.5.1 Genetik der Studienkohorte**

In der Literatur sind über 350 verschiedene Mutationen im GAA-Gen für die Erkrankung des Morbus Pompe bekannt (<http://cluster15.erasmusmc.nl>). Aufgrund des Vererbungsmusters liegt bei den Patienten auf beiden Allelen jeweils eine pathogene Mutation vor, die jedoch unterschiedlich sein kann (compound Heterozygotie).

In der untersuchten Studienkohorte lagen genetische Daten von 37 LOPD Patienten vor. Es konnten 26 verschiedene Mutationen nachgewiesen werden (Abb. 26). Die Splice site Mutation c.-32-13T>G auf dem Intron 1 ließ sich am häufigsten (94,6 %) nachweisen (Abb. 26). Diese Mutation ist auch in der Literatur als häufige Mutation bei LOPD Patienten beschrieben (Kroos et al., 2012, Tabelle 10). Als zweithäufigste Mutation zeigte sich die Deletionsmutation c.525delT (18,9 %) (Abb. 26). Die Kombination aus der Splice site Mutation c.-32-13T>G und der Deletionsmutation c.525delT stellte mit 7 Patienten (18,9 %) die häufigste Allelkombination dar (Abb. 26). Eine andere Kombination zeigte sich bei Auftreten der Deletionsmutation c.525delT nicht. Insgesamt konnten 25 verschiedene Allelkombinationen erfasst werden (Tabelle 11).

**Tabelle 10: Genotyp-Phänotyp Korrelation in der Literatur bei LOPD Patienten: Literaturrecherche**

Autor	Pompe disease IOPD (A) LOPD (B)	Fallzahl (n)	Genotyp	Ergebnisse
Johnson et al., 2017	B	(B) 35	c.-32-13T>G (17,4%)	hohe Heterogenität im Ausprägungsgrad der verschiedenen Mutationen sowie des klinischen Phänotyps
Fukuhara et al., 2017	A, B	(A) 6 (B) 32	c.546G>T (22,9%), c. 1857C>G (14,3%)	c.1857C>G bei japanischen IOPD Patienten häufigste Mutation. c.546G>T bei japanischen LOPD Patienten häufigste Mutation
Nazari F. et al., 2017	B	(B) 14	c.-32-13T>G (60%)	c.-32-13T>G Mutation bei LOPD Patienten im Iran häufigste Mutation, hohe klinische Heterogenität
Bekircan-Kurt et al., 2017	B	(B) 7	c.-32-13T>G (57,1%)	LOPD Patienten mit homozygoter c.-32-13T>G Mutation mit schwererem Verlauf
Van Capelle et al., 2016	A	(A) 31	c.-32-13T>G (67,7%)	IOPD mit c.-32-13T>G scheinen weniger stark betroffen, mehrheitlich Jungen mit dieser Splice Site Mutation. Hohe klinische Heterogenität
Montagnese et al., 2015	B	(B) 30	c.-32-13T>G (96,6%)	> 90% der LOPD Patienten mit c.-32-13T>G und stark ausgeprägter Heterogenität im klinischen Phänotyp, keine Genotyp-Phänotyp Korrelation
De Filippi et al., 2014	B	(B) 85	c.-32-13T>G (100%), c.525delT (24,7%)	Korrelation Genotyp - klinischer Phänotyp, Einfluss von ACE-, ACTN3-Polymorphismus
Liu X et al., 2014	B	(B) 27	c.2238G>C (55,6%), c.-32-13T>G (3,7%)	c.2238G>C häufigste Mutation der chinesischen LOPD Population
Wens et al., 2013	B	(B) 50	c.-32-13T>G (100%), c.525delT (54,5%)	klinisch heterogener Krankheitsverlauf bei LOPD Patienten, auch in Familien mit dem identischen GAA-Genotyp
Herzog et al., 2012	A, B	(A) 3 (B) 39	c.-32-13T>G (79,5%)	LOPD Patienten mit c.-32-13T>G Mutation zeigen im Vergleich zu anderen Patienten einen späteren Krankheitsbeginn
Kroos et al., 2012	B	overview	c-32-13T>G häufigste Mutation bei LOPD	Korrelation zwischen GAA-Aktivität und klinischem Phänotyp beobachtet. Modifizierende Faktoren jedoch vor allem bei der c.-32-13T>G Mutation wahrscheinlich, deren Patienten einen sehr variablen klinischen Phänotyp aufweisen



**Abbildung 26: Verteilung der Mutationen im GAA-Gen in der Studienkohorte (Allel 1, Allel 2)**

Die Splice-Site Mutation c.-32-13T>C sowie die Deletionsmutation c.525delT zeigten sich als häufigste Allelkombination (18,9%) unter den LOPD Patienten. Insbesondere im 2. Allel zeigte sich eine hohe Variabilität der pathogenen Mutationen.

In der Rotterdamer Datenbank sind die bisher bekannten Mutationen von LOPD Patienten aufgeführt und die resultierenden Krankheitseffekte notiert: Diese Einteilung erfolgte anhand von GAA-Restenzymaktivitätsmessungen und die einzelnen Mutationen werden unter anderem als "(potentially) less severe", "very severe" oder "unknown" beschrieben (<http://cluster15.erasmusmc.nl>). In der vorliegenden Arbeit haben wir diese Effekte als mild (blau), schwere (rot) und bisher unbekannte (grau) Krankheitseffekte unterschieden (Tabelle 11). In der Studie wiesen 11 Patienten (30%) auf beiden Allelen als mild beschriebene Mutationen auf. 18 Patienten (49%) präsentierten eine Allelkombination mit jeweils einer als mild und einer als schwer beschriebenen Mutation. 6 Patienten (16%) zeigten Mutationen mit bisher unbekanntem Krankheitseffekt. Bei 3 Patienten (8%) wurde nur auf dem 1. Allel eine bekannte Mutation gefunden (Tabelle 11):

Tabelle: 11 Mutationen im GAA-Gen und Zuordnung zu beschriebenen Krankheitseffekten

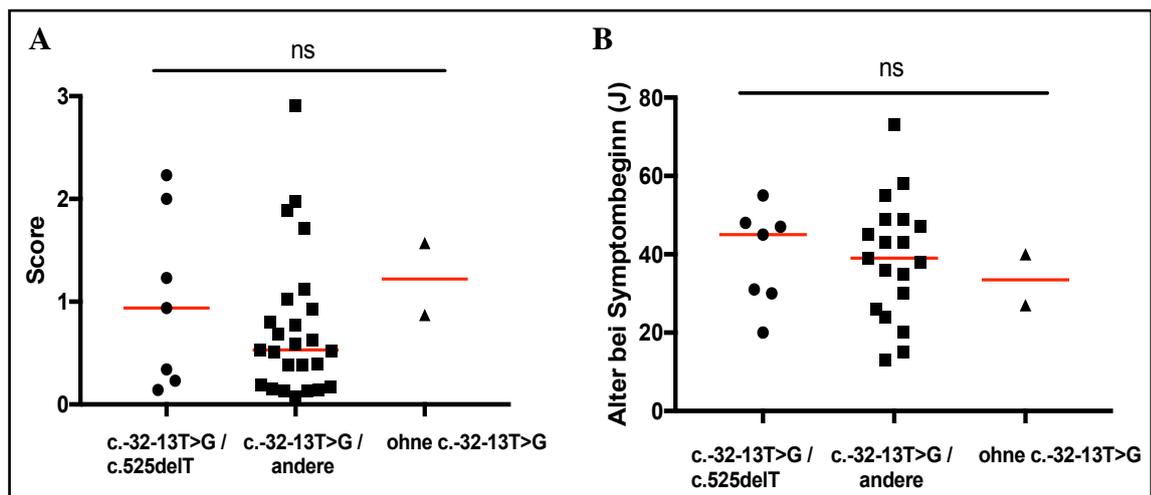
Patient	Allel 1	Allel 2
P3	c.-32-13T>G	c.525delT
P17	c.-32-13T>G	c.525delT
P24	c.-32-13T>G	c.525delT
P30	c.-32-13T>G	c.525delT
P48	c.-32-13T>G	c.525delT
P51	c.-32-13T>G	c.525delT
P52	c.-32-13T>G	c.525delT
P9	c.-32-13T>G	c.794delG
P10	c.-32-13T>G	c.794delG
P34	c.-32-13T>G	c.118C>T
P42	c.-32-13T>G	c.118C>T
P13	c.-32-13T>G	c.2078_2079insA
P25	c.-32-13T>G	c.2608C>T
P28	c.-32-13T>G	c.1822
P1	c.-32-13T>G	c.1076-1G>A
P37	c.-32-13T>G	c.2242G>T
P41	c.-32-13T>G	c.271delG
P8	c.-32-13T>G	c.1548G>A
P15	c.-32-13T>G	c.1655T>C
P32	c.-32-13T>G	c.1655T>C
P11	c.-32-13T>G	c.1495T>A
P16	c.-32-13T>G	c.925G>A
P18	c.-32-13T>G	c.1942G>A
P19	c.-32-13T>G	c.2055C>A
P20	c.-32-13T>G	c.1829C>T
P21	c.-32-13T>G	c.1064T>C
P22	c.-32-13T>G	c.1075 G>A
P12	c.-32-13T>G	c.307T>G
P36	c.-32-13T>G	c.655G>A
P4	c.-32-13T>G	c.2407C>T
P6	c.-32-13T>G	bp Del (IVS16+102_IVS17+31)
P29	c.-32-13T>G	c.1127delGGinsC
P23	c.-32-13T>G	/
P27	c.-32-13T>G	/
P40	c.1478C>T	/
P14	c.1655T>C	c.1478C>T
P53	536bpDel	c.-32-13T>G

Die Krankheitseffekte lassen sich nach der Rotterdamer Pompe Daten Bank in mild (blau), schwer (rot) und bisher unbekannte (grau) Mutationen unterscheiden. Bei drei Patienten (P23, P27, P40) wurde keine bekannte pathogene Mutation auf dem 2. Allel im GAA-Gen gefunden.

## **4.5.2 Analyse des Genotyps anhand morphologischer und klinischer Parameter**

### **4.5.2.1 Analyse der Splice Site Mutation (c.-32-13T>G) - Träger und der restlichen Kohorte**

Die 37 LOPD Patienten sind in der Studie nachfolgend in 3 Subgruppen unterteilt worden. Eine Gruppe mit der häufigsten Allelkombination (c.-32-13T>G/c.525delT), eine Gruppe mit den LOPD Patienten, die zusätzlich zu der Splice Site Mutation c.-32-13T>G eine andere Mutation zeigten und eine dritte Gruppe, bei der auf keinem Allel die Splice Site Mutation c.-32-13T>G vorlag. Eine Analyse der Muskelpathologie (Score) der LOPD Patienten mit c.-32-13T>G/c.525delT Mutation (n=7 Median 0.94 (0.14-2.23)) ergab im Vergleich mit LOPD Patienten mit c.-32-13T>G und anderer Mutation (n=25 Median 0.53 (0.07-2.91)) sowie mit Patienten mit fehlender Splice Site Mutation (non c.-32-13T>G; n=2 Median 1.22 (0.87-1.57)) keine signifikanten Unterschiede zueinander (p=0.37) (Abb. 27 A). Ebenso zeigte eine Analyse des Alters bei Symptombeginn der LOPD Patienten mit -32-13T>G/c.525delT Mutation (n=7 Median 45 (20-55)) im Vergleich mit LOPD Patienten mit c.-32-13T>G und anderer Mutation (n=19 Median 39 (13-73)) sowie mit Patienten mit fehlender Splice Site Mutation (ohne c.-32-13T>G; n=2 Median 33.5 (27-40)) keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Subgruppen zueinander (p=0.79) (Abb. 27 B, Tabelle 12).



**Abbildung 27: Score und Alter bei Symptombeginn in Abhängigkeit der GAA-Allelkombinationen**

Der Vergleich der Allelkombinationen mit dem Muskelscore ( $p=0.37$ ) und dem Alter bei Symptombeginn ( $p=0.79$ ) ergab keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis test).

**Tabelle 12: Zusammenfassung der Analysen des Genotyps im Vergleich zum Muskelscore sowie des Alters bei Symptombeginn**

	Genetik	Anzahl (n)	Median (-/+)	Signifikanz (p)*
<b>Score</b>	c.-32-13T>G/ c.525delT	7	0.94 (0.14-2.23)	0.37 (ns)
	c.-32-13T>G/ andere	25	0.53 (0.07-2.91)	0.37 (ns)
	ohne c.-32-13T>G	2	1.22 (0.87-1.57)	0.37 (ns)
<b>Alter bei Symptombeginn (J)</b>	c.-32-13T>G/ c.525delT	7	45 (20-55)	0.79 (ns)
	c.-32-13T>G/ andere	19	39 (13-73)	0.79 (ns)
	ohne c.-32-13T>G	2	33.5 (27-40)	0.79 (ns)

n.s.= nicht signifikant

#### 4.5.2.2 Analyse der Allelkombinationen nach den Krankheitseffekten der Rotterdamer Datenbank

Eine Analyse der Daten ergab, dass zwischen den Patienten mit zwei als mild beschriebenen Mutationen (n=11; Score Median 0.53 (0.07-2.91), den Patienten mit einer als mild und einer als schwer beschriebenen Mutation (n=18; Median 0.70 (0.14-2.23) sowie Patienten mit einer als mild und einer als unbekannt bezeichneten Mutation (n=5; Median 0.59 (0.13-1.57) keine signifikanten Unterschiede im Ausprägungsgrad der Muskelpathologie vorliegen (Score  $p=0.48$ ) (Abb. 28 A). Diese Ergebnisse zeigten sich auch in der Korrelationsanalyse mit dem Alter bei Symptombeginn. Patienten mit zwei als mild beschriebenen Mutationen (n=9 Median 43 Jahre (15-73)), Patienten mit einer als mild und einer als schwer beschriebenen Mutation (n=15 Median 36 (13-55)) und Patienten mit einer als mild und einer als unbekannt bezeichneten Mutation (n=4 Median 41.5 (27-58)) zeigten hinsichtlich der Muskelpathologie und dem Alter bei Symptombeginn keine signifikanten Unterschiede zueinander ( $p=0.57$ ) (Abb. 28 B).

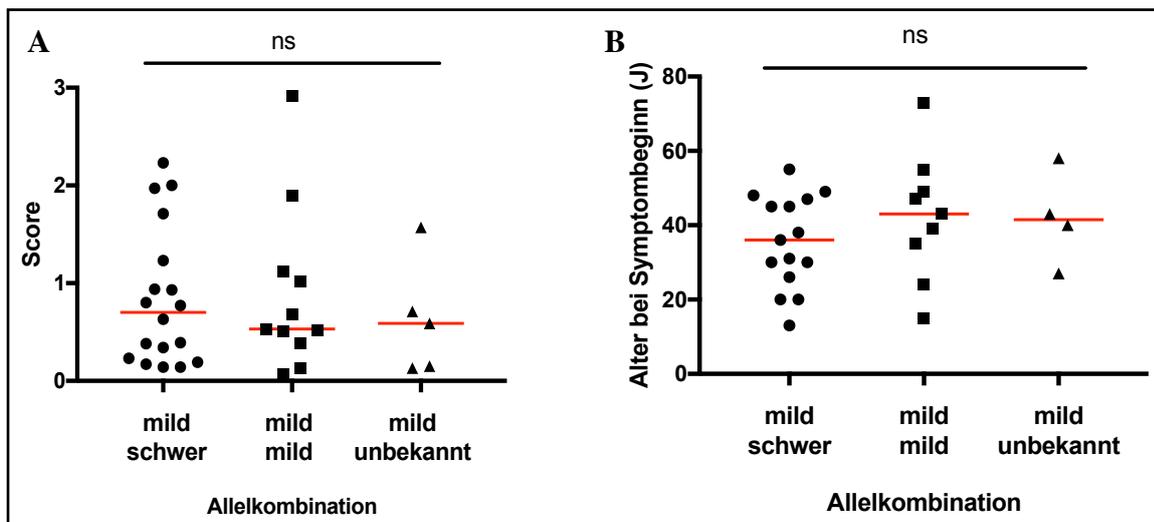


Abbildung 28: Abhängigkeit der Muskelpathologie sowie des Alters bei Symptombeginn von den GAA-Allelkombinationen und deren Krankheitseffekten

Der Vergleich der Kombinationen mild/schwer gegenüber mild/mild sowie mild/unbekannt auf den beiden Allelen zeigte keinen signifikanten Unterschied im Muskelscore ( $p=0.78$ , A) sowie im Alter bei Symptombeginn ( $p=0.57$ , B), Kruskal-Wallis-Test.

### 4.5.2.3 Analyse der Allelkombinationen und der GAA-Restenzymaktivität

Es wurde der Genotyp der LOPD Patienten mit der vorhandenen Restenzymaktivität verglichen. Von 7 Patienten mit c.-32-13T>G/c.525delT Allelkombination lagen Daten von 2 Patienten zur GAA-Restenzymaktivität vor (Median 15.25 (5.9-24.59)). Im Vergleich zu den restlichen Patienten mit c.-32-13T>G Mutation (n=12, Median 21.98 (4.59-39.0)) lagen keine signifikanten Unterschiede vor ( $p=0.66$ ) (Abb. 29 A). In der Analyse zwischen den Patienten mit mild-schwerer (n=6; Median 14.75 (5.09-24.59)) Allelkombination und Patienten mit mild-milder Allelkombination (n=7; Median 27.0 (4.59-39.0)) konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der GAA-Restenzymaktivität gefunden werden. Eine Tendenz zu höheren GAA-Restenzymaktivitätswerten bei den Patienten mit mild-milder Allelkombination konnte allerdings festgestellt werden (Abb. 29 B).

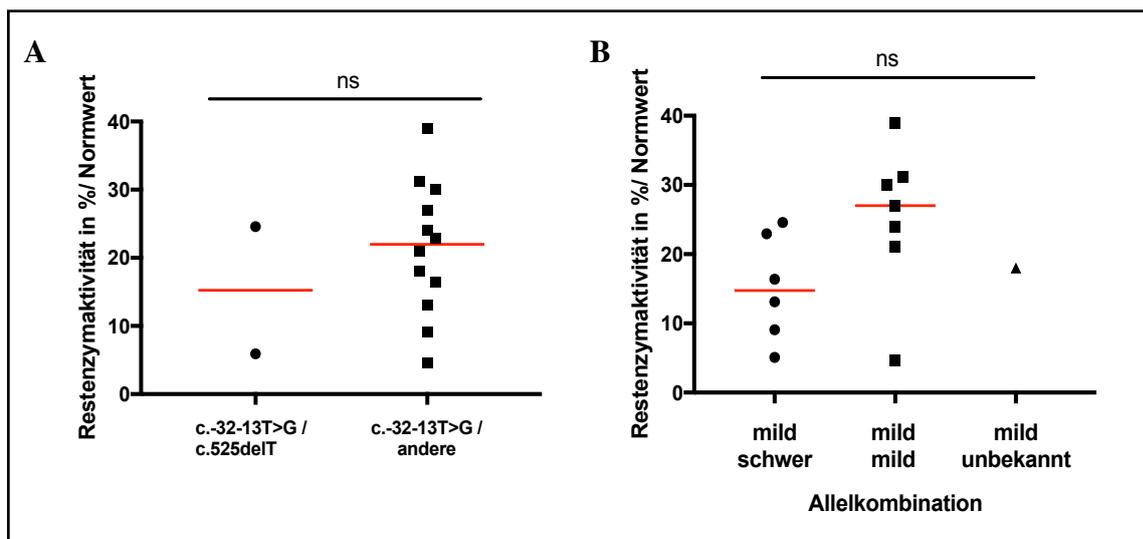


Abbildung 29: Abhängigkeit der GAA-Restenzymaktivität von den GAA-Allelkombinationen und deren Krankheitseffekten

Patienten mit der häufigsten Allelkombination c.-32-13T>G/c.525delT zeigten gegenüber den restlichen Patienten keine signifikanten Unterschiede in der GAA-Restenzymaktivität ( $p=0.66$ ). Der Vergleich der Allelkombination mild/schwer gegenüber mild/mild zeigte keinen signifikanten Unterschied in der GAA-Restenzymaktivität ( $p=0.10$ ), Mann-Whitney-Test.

### **Zusammenfassung bisheriger Ergebnisse:**

- 1.** In vorliegender Kohorte von 37 LOPD Patienten zeigte sich eine für LOPD Patienten typische Häufigkeitsverteilung der Mutationen mit einem Vorkommen der c.-32-13T>G Mutation > 90%.
- 2.** Es zeigte sich keine signifikante Korrelation des Genotyps mit der Muskelpathologie (Score) der LOPD Patienten.
- 3.** Es zeigte sich keine signifikante Korrelation der Allelkombinationen mit in der Rotterdamer Datenbank zugeschriebenen Krankheitseffekten (mild, schwer, unbekannt) und der Muskelpathologie (Score) der LOPD Patienten.
- 4.** Es zeigte sich keine signifikante Korrelation der Allelkombinationen mit in der Rotterdamer Datenbank zugeschriebenen Krankheitseffekten (mild, schwer, unbekannt) auf den individuellen Krankheitsbeginn (disease onset) der LOPD Patienten.
- 5.** Es zeigte sich keine signifikante Korrelation der Allelkombinationen mit in der Rotterdamer Datenbank zugeschriebenen Krankheitseffekten (mild, schwer, unbekannt) auf die gemessene GAA-Restenzymaktivität.

## 5 Diskussion

In den letzten Jahren wurde durch genetische Analysen die Diagnostik des Morbus Pompe verbessert (Savarese, Torella et al. 2018). Allerdings ist die Pathophysiologie der Erkrankung noch nicht vollständig verstanden. Insbesondere ist unklar, warum Patienten mit LOPD (late onset Pompe disease) und identischen Mutationen eine ausgeprägte Variabilität in der klinischen Symptomatik und im Krankheitsprogress aufweisen (Kishnani, Beckemeyer et al. 2012; Kroos, Hoogeveen-Westerveld et al. 2012; Wens, van Gelder et al. 2013; Montagnese, Barca et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde der Ansatz verfolgt, dass möglicherweise eine genaue Analyse der Muskelpathologie hilft, die Erkrankung und ihre Heterogenität besser zu verstehen. In der vorliegenden Studie wurden Skelettmuskelbiopsien von LOPD Patienten detailliert untersucht und mit klinischen Daten, Laborparametern sowie genetischen Befunden korreliert.

Morbus Pompe Patienten haben aufgrund des lysosomalen Enzymdefektes (saure alpha-1,4-Glukosidase) einen gestörten Glykogenstoffwechsel und konsekutiv eine pathologische Glykogenakkumulation in den Muskelzellen, sodass es zu einer fortschreitenden Zerstörung der Zellstrukturen samt Funktionsverlust der Muskelfasern kommt (Hirschhorn 2001). Die bei Morbus Pompe Patienten ausgeprägte Variabilität des klinischen Phänotyps zeigt sich bereits an den unterschiedlichen Verlaufsformen. Die infantilen Pompe Patienten (IOPD) haben abhängig von der GAA-Restenzymaktivität sowie der Genetik einen frühen Symptombeginn vor dem Erreichen des 1. Lebensjahres und zeigen eine ausgeprägte Kardiomyopathie. Dagegen weisen late onset Pompe Patienten (LOPD) erst nach Ablauf des 1. Lebensjahres erste Krankheitszeichen auf und zeigen meist keine manifeste kardiale Beteiligung (Kishnani, Beckemeyer et al. 2012). Aufgrund der großen Heterogenität in ihrem klinischen Krankheitsprogress und ihrer vielfältigen klinischen Befunde (Schwäche der Gliedergürtelmuskulatur und Einschränkung der motorischen Fähigkeiten, respiratorische Insuffizienz, CK-Elevation, kardiale Rhythmusstörungen etc.) wird die Erkrankung bei LOPD und IOPD Patienten auch als Multi-Systemerkrankung bezeichnet (Mueller-Felber et al. 2007; Toscano and Schoser et al. 2013, Montagnese et. al, 2015).

Vor allem für IOPD Patienten ist eine Korrelation zwischen der GAA-Restenzymaktivität und dem klinischen Krankheitsverlauf bekannt. Infantile Pompe Patienten (<1%) haben im Vergleich zu LOPD Patienten (25-45%) eine deutlich reduzierte GAA-Restenzymaktivität (Kroos, Hoogeveen-Westerveld et al. 2012). Dieser Einfluss auf den

klinischen Krankheitsverlauf ist bei den IOPD Patienten auf die zwei vorliegenden pathologischen Mutationen im GAA-Gen zurückzuführen (Kroos, Hoogeveen-Westerveld et al. 2012). IOPD Patienten mit als "schwer" eingestuften Mutationen in der Rotterdamer Datenbank zeigen einen schweren Krankheitsverlauf (<http://cluster15.erasmusmc.nl>). Eine in der Literatur häufig beschriebene Mutation, die bei IOPD zu schweren Krankheitserscheinungen führt, ist die Deletionsmutation c.525delT (Leslie and Bailey 1993; van Capelle, van der Meijden et al. 2016), die auch bei 18,9% der in der Studie untersuchten LOPD Patienten zu finden war. Bei den LOPD Patienten zeigten jedoch bisherige Analysen keine strikte Genotyp-Phänotyp Korrelation (Montagnese et al., 2015). Es ist interessant, dass bisherige Studien die hohe Variabilität der klinischen Symptomatik bei LOPD Patienten auch in Geschwisteruntersuchungen mit identischem Genotyp im GAA-Gen und vergleichbarer Restenzymaktivität belegen (Kroos et al., 2012; Wens et al., 2013; Montagnese et al. 2014; Schänzer, Giese et al. 2017).

Bei Patienten mit IOPD geht man davon aus, dass ein frühzeitiger Therapiebeginn zu einem verbesserten klinischen Outcome der Patienten führt, sodass in einzelnen Ländern bereits ein Neugeborenencreening (NBS) etabliert ist (Chien, Lee et al. 2009). Allerdings kann auch bei den IOPD Patienten bereits eine direkt postpartal eingeleitete Enzyersatztherapie einen schweren klinischen Verlauf mitunter nicht verhindern, da zu diesem Zeitpunkt bereits stark ausgeprägte myopathologische Veränderungen vorhanden sein können (Schänzer, Giese et al. 2017). Aktuell wird ein Neugeborenencreening (NBS) in Österreich, Italien, Ungarn, Japan, Taiwan und in den USA durchgeführt (Chien, Chiang et al. 2008; Bodamer, Scott et al. 2017). In dem Neugeborenencreening (NBS) erfolgt zusätzlich zur GAA-Restenzymaktivitätsbestimmung eine genetische Analyse. Relevant ist jedoch, dass nicht nur IOPD typische Mutationen des GAA-Gens detektiert werden, sondern zusätzlich auch Mutationen, die mit einer LOPD assoziiert sind. Im Vergleich zu IOPD Patienten, bei denen typische Mutationen mit einem schweren klinischen Phänotyp einhergehen, kann bei LOPD Patienten von dem Genotyp nicht auf den klinischen Phänotyp geschlossen werden. Es stellt sich demnach die Frage, ob auch bei diagnostizierten LOPD Patienten eine direkt eingeleitete Therapie zu empfehlen ist, obwohl noch keine Symptome vorliegen (Chien, Lee et al. 2011). Neben einer fehlenden Prognose über den individuellen Krankheitsverlauf sind auch die Folgen einer möglichen Therapieentscheidung für die Patienten zu berücksichtigen. Diese beinhalten eine engmaschige zeitaufwendige Anbindung an ein Spezialzentrum, hohe

Therapiekosten, Nebenwirkungen und einen unsicheren Nutzen für die Patienten. Es gibt aber auch Daten, die zeigen, dass eine frühzeitige Therapie vor Beginn sicherer Krankheitssymptome bei Patienten mit LOPD sinnvoll sein kann und andernfalls ein bestmöglicher Therapiezeitpunkt versäumt werden würde (Chien, Lee et al. 2011).

Morbus Pompe ist eine der ersten genetisch bedingten Muskelerkrankungen, für die ein kausaler Therapieansatz in Form einer Enzyersatztherapie (ERT) mit rekombinantem GAA-Enzym zur Verfügung steht (Van den Hout, Reuser et al. 2000; Amalfitano, Bengur et al. 2001; Van den Hout, Reuser et al. 2001; Van den Hout, Kamphoven et al. 2004; Winkel, Van den Hout et al. 2004; Thurberg, Lynch Maloney et al. 2006).

Bei IOPD und LOPD Patienten konnte unter Enzyersatztherapie (ERT) eine gute Glykogen Clearance, das heißt eine Verminderung der pathologischen Glykogenablagerungen im Muskelgewebe sowie eine Verbesserung der Muskelkraft gezeigt werden (Winkel, Kamphoven et al. 2003; Thurberg, Lynch Maloney et al. 2006; van der Ploeg, Carlier et al. 2016; Ripolone, Violano et al. 2017; Schänzer, Kaiser et al. 2017). Studien belegen, dass das Herzmuskelgewebe dabei deutlich besser als das Skelettmuskelgewebe auf die Enzyersatztherapie (ERT) anspricht (Hahn and Schänzer 2019), wobei die Patienten schlechter auf die Enzyersatztherapie (ERT) ansprechen, wenn der Therapiebeginn zu einem späten Zeitpunkt erfolgt und die Glykogenakkumulation, Fibrosierung sowie autophagischen Veränderungen in einem fortgeschrittenen Stadium vorliegen (Ripolone, Violano et al. 2017, Schänzer, Giese et al. 2017). Die Enzyersatztherapie (ERT) kann bisher aufgrund der nicht passierbaren Blut-Hirn-Schranke keine Clearance der Glykogenakkumulation in den Neuronen und Gliazellen etc. ermöglichen und ist dahingehend therapielimitiert. Eine Gentherapie und die intrathekale Applikation zeigten am Mausmodell bisher eine verbesserte neuromuskuläre Symptomatik, sodass neue Therapieansätze die adäquate Behandlung der ZNS-Pathologien (Glykogenakkumulation) miteinschließen sollten (Hordeaux et al. 2017, Byrne et al. 2019).

## **5.1 Studiendesign**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Muskelbiopsien von LOPD Patienten detailliert zu analysieren und mit verschiedenen klinischen sowie laborchemischen Parametern, insbesondere dem individuellen Genotyp, zu korrelieren. Im Vergleich zu bisher publizierten Daten zeichnet sich vorliegende Studie durch die bisher größte Kohorte

(n=53) an untersuchten Muskelbiopsien von LOPD Patienten aus (Schoser, Muller-Hocker et al. 2007; Werneck, Lorenzoni et al. 2013; Feeney, Austin et al. 2014; van der Ploeg, Carlier et al. 2016; Ripolone, Violano et al. 2017; Golsari, Nasimzadah et al. 2018). Die in dieser Arbeit untersuchten LOPD Patienten zeigten eine Alters- und Geschlechterverteilung entsprechend anderer Studien (Schoser, Muller-Hocker et al. 2007; Ripolone, Violano et al. 2017; Loscher, Huemer et al. 2018). Das Patientenalter lag zum Biopsiezeitpunkt bei einer Altersspanne von 14-78 Jahren im Mittel bei 44 Jahren, wobei Männer mit 54,7 % geringfügig gegenüber Frauen überwogen. Beim Auftreten erster Symptome waren die LOPD Patienten im Mittel 39 (8-73) Jahre alt. Die Zeit zwischen Krankheitsbeginn und Muskelbiopsieentnahme lag bei ca. 5 (0-26) Jahren. Diese Ergebnisse korrelieren mit anderen Arbeiten (Loscher, Huemer et al. 2018). Es sind jedoch auch deutlich längere Zeiträume von bis zu 10 Jahren bis zur Diagnosestellung beschrieben (Muller-Felber, Horvath et al. 2007; Schuller, Wenninger et al. 2012), so erhielt auch ein Patient in unserer Studie erst 26 Jahre nach Beginn der Symptome die Diagnose.

In vorliegender retrospektiver Studie sind zum Teil Patienten aus früheren Jahren eingeschlossen. Diese würden womöglich heute aufgrund der Entwicklungen in der Diagnostik, unter anderem durch die Einführung eines Trockenbluttestes (DBS), früher diagnostiziert werden. Die Diagnose wird allerdings bei LOPD Patienten aufgrund des variablen Krankheitsverlaufs mit zum Teil unspezifischen Symptomen erschwert (Vissing, Lukacs et al. 2013).

## **5.2 Muskelpathologie bei LOPD Patienten**

Die Muskelpathologie bei Morbus Pompe Patienten ist durch eine vakuoläre Myopathie mit pathologischer Glykogenakkumulation in lysosomalen sowie extralysosomalen Zellarealen unter Beteiligung einer gestörten Autophagie gekennzeichnet (Hirschhorn 2001; Schoser, Muller-Hocker et al. 2007; Lim, Li et al. 2014; Schänzer, Kaiser et al. 2017). Die Analyse der Muskelpathologie in der vorliegenden Studie erfolgte an Glutaraldehyd fixiertem, in Kunststoff eingebettetem Material. Die angefertigten PAS-Färbungen zeigten eine sehr gute Zellmorphologie sowie eine gute Darstellung der intra- und extralysosomalen Glykogenablagerungen (Schänzer et al. 2017). Zudem war das Gewebe durch die Fixierung und Einbettung gut zu versenden und es konnten viele Schnittpräparate von einer Probe angefertigt werden. Nachteilig ist dagegen der sehr hohe

Aufwand der Anfertigung von Semidünnschnitten, welche nur in einem Speziallabor erfolgen kann. Auch zeigten sich in den Semidünnschnitten teilweise kleine Probenabschnitte, die ein Sampling Error beinhalten könnten. Limitiert zeigte sich die Studie darin, dass bei der Multiorganerkrankung LOPD die Untersuchungen nur an quergestreifter Skelettmuskulatur erfolgt sind und unter anderem Pathologien an glatter Muskulatur nicht berücksichtigt sind.

Die Quantifizierung der Muskelpathologie erfolgte anhand eines definierten Muskelscores und wurde initial an IOPD Patienten etabliert (Schänzer et. al 2017). In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, ob sich der Muskelscore auch auf LOPD Patienten anwenden lässt. Da die Pathologie meist geringer ausfällt, wurde das Kreuzraster im Vergleich zu den Analysen an IOPD Patienten (81 Kreuze/Bild) engmaschiger angelegt (256 Kreuze/Bild), um auch geringere Veränderungen quantifizieren zu können. Neben der Quantifizierung der Glykogenablagerungen wurden zusätzlich autophagische Vakuolen (AV), large empty vacuoles (LEV) sowie fibrotische Veränderungen der Muskelbiopsien erfasst. Durch die Erhebung eines standardisierten Score-Wertes gelang eine quantifizierbare Zusammenfassung dieser einzelnen Pathologika. Dies ermöglichte im Folgenden eine Korrelation mit anderen klinischen sowie laborchemischen Parametern.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Muskelscore zur Quantifizierung der Muskelpathologie bei den untersuchten LOPD Patienten in hohem Maße geeignet war, da alle einzelnen Parameter (Glykogen, autophagische Vakuolen (AV), large empty vacuoles (LEV), Fibrose) gut miteinander korreliert haben.

Bisherige Untersuchungen an IOPD Patienten zeigten eine stark ausgeprägte pathologische Glykogenakkumulation (Schänzer et al. 2017). Die in vorliegender Studie durchgeführten Analysen an Muskelbiopsien von LOPD Patienten ergaben im Vergleich eine deutliche geringere Muskelpathologie: So haben 75 % der LOPD Patienten einen maximalen Score-Wert von 1 (0.07-3.77) und zeigten eine Glykogenakkumulation von weniger als 10 %. In einer Arbeit von Schänzer et al. zeigten Analysen an 13 IOPD Patienten im Vergleich bei 61 % der Patienten einen mittleren (morphologischen) Score (Mo-Index) von  $> 3$  sowie bei 76% eine Glykogenakkumulation von mindestens 50 % im untersuchten Muskelgewebe (Schänzer et al. 2017). Korrelierend hierzu lag die GAA-Restenzymaktivität der LOPD Patienten in unserer Studie im Median bei 18 % (3-39). Dies ist ein Restenzymaktivitätswert, der im Vergleich zu IOPD Patienten deutlich höher liegt (Kroos, Hoogeveen-Westerveld et al. 2012). Darüber hinaus zeigte sich auch in

unserer Arbeit im ermittelten Score-Wert (0.07-3.77) eine ausgeprägte Variabilität der myopathologischen Befunde. Diese Heterogenität in der Muskelpathologie bestätigt bisherige Untersuchungen an LOPD Patienten. Viele Studien dokumentierten unter anderem im Ausprägungsgrad der intra- bzw. zytoplasmatischen Glykogenakkumulation sowie im Vorkommen von autophagischen Vakuolen samt autofluoreszenten Lipofuscineinschlüssen eine hohe Variabilität (siehe S. 14, Abb.2) (Muller-Felber, Horvath et al. 2007; Schoser, Muller-Hocker et al. 2007; Lewandowska, Wierzb-Bobrowicz et al. 2008; Hobson-Webb, Proia et al. 2012; Feeney, Austin et al. 2014; Lim, Li et al. 2014; de la Mata, Cotán et al. 2016).

### **5.2.1 Autophagische Prozesse im Skelettmuskel bei LOPD Patienten**

Bei Morbus Pompe Patienten sind möglicherweise zusätzliche Abläufe der zelleigenen Autophagie für die Muskelpathologie verantwortlich. Ein Zusammenhang zwischen gestörter Autophagie und einer signifikanten Muskelatrophie ist bekannt (Nascimbeni, Fanin et al. 2012). So dokumentierten auch Raben et al. bei LOPD Patienten eine deutliche Anhäufung von autophagischem Material mit Zerstörung der Myofibrillen (Raben, Hill et al. 2008). Es sind vermehrt Ablagerungen an unverdaulichem zytosolischen Material, membrangebundene Vesikel und Vakuolen mit autophagischen Markern wie *LC-3* bei LOPD Patienten zu finden (Lim, Li et al. 2014).

Schänzer et al. zeigten, dass bei einem Brüderpaar mit IOPD und identischem Genotyp, der jüngere Bruder trotz der durch pränatale Diagnostik postpartal eingeleiteten Therapie einen klinisch schlechteren Verlauf aufwies als sein älterer Bruder. In Muskelbiopsien nach 1 Monat zeigten sich hier schon deutliche strukturelle Veränderungen mit ausgeprägter Anhäufung von autophagischen Vakuolen, *LC-3* und *p62* positiven Einschlüssen sowie fortgeschrittener Myofibrillenzerstörung (Schänzer, Giese et al. 2017). Korrelierend zu diesen Befunden ergaben Untersuchungen, dass vor allem Patienten mit geringen autophagischen Veränderungen am besten auf eine Enzyersatztherapie angesprochen haben (Fukuda, Ewan et al. 2006; Schänzer, Giese et al. 2017; Schänzer, Rupp et al. 2018). Diese Ergebnisse zeigten sich auch bei Betrachtung der histopathologischen Effekte unter Enzyersatztherapie. Bei Patienten mit nur geringer Verbesserung der Muskelpathologie konnten in Muskelbiopsien nach Beginn der Therapie gesteigerte autophagische Markerproteine *p62* und *LC-3* als Ausdruck der

fortgeschrittenen Akkumulation von autophagischem Material nachgewiesen werden (Ripolone, Violano et al. 2017).

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass mit steigender Muskelpathologie auch eine gesteigerte Autophagie vorlag. So ließ sich bei hohem Muskelscore und deutlicher Glykogenakkumulation eine Zunahme an autophagischen Vakuolen (AV) sowie large empty vacuoles (LEV) zeigen. Diese Ergebnisse weisen auf die wichtige Funktion der Autophagie als Bestandteil der Pathophysiologie, vor allem im fortgeschrittenen Stadium bei LOPD Patienten hin. Interessant ist, dass sich auch in Einzelfällen bei gering ausgeprägter Muskelpathologie (niedriger Score, geringe Glykogenakkumulation) schon ein erhöhtes Vorkommen von autophagischen Vakuolen beobachten lässt (s. Fallbeispiel 2, S.53). Bezüglich der Modulation der gestörten Autophagiemechanismen gibt es für Morbus Pompe Patienten in den letzten Jahren neue Therapieansätze. Die Identifizierung einzelner Strukturen, die an der Autophagie und deren Regulierung beteiligt sind, sowie die gezielte Steuerung der einzelnen Moleküle kann in Zukunft ein wichtiger Ansatzpunkt weiterer Therapiemöglichkeiten sein. Unter anderem sind bisher für die Verbesserung der Autophagosomen-Lysosom-Fusion, die Behebung von Defekten im *mTOR*-Signalweg sowie für die Inaktivierung von an der Autophagie beteiligter Gene (u.a. *Atg7*) positive Auswirkungen auf die pathologischen Zellveränderungen und unter anderem eine bessere Wirksamkeit der Enzymersatztherapie (ERT) beschrieben worden. (Raben, Schreiner et al. 2010; Laplante and Sabatini 2012; Malicdan and Nishino 2012; Lim, Li et al. 2017; Lim, Li et al. 2019). Ebenfalls sind in den letzten Jahren bei Pompe Patienten zunehmend die Muskelsatellitenzellen untersucht worden. Bekannt ist, dass Muskelsatellitenzellen, die u.a. bei auftretenden Muskelschäden für eine Regeneration des Muskelgewebes zuständig sind, im direkten Zusammenhang mit der Höhe der autophagischen Zellaktivität stehen (Schaaf, Canibano-Fraile et al. 2019). Bei LOPD Patienten scheint die Aktivierung der Muskelsatellitenzellen unzureichend und dadurch die Reparatur der Skelettmuskelzelle erheblich gestört zu sein (Schoser et al. 2019). Die Aktivierung und die Regenerationsfähigkeit der Satellitenzellen durch modulierende Faktoren zu verbessern könnte in Zukunft ebenfalls ein neuer therapeutischer Ansatzpunkt für LOPD Patienten sein.

In der vorliegenden Studie konnte keine Korrelation zwischen autophagischen Veränderungen mit klinischen Parametern wie dem Alter bei Biopsie oder der individuellen Krankheitsdauer (duration) gezeigt werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die autophagischen Veränderungen bei LOPD Patienten primär

unabhängig von Prozessen der Zellalterung anzusehen sind und einen eigenständigen Krankheitscharakter aufweisen. Einschränkend ist zu erwähnen, dass die Autophagie in unserer Arbeit anhand von morphologischen Veränderungen untersucht wurde und aufgrund des vorhandenen Resin-Gewebes keine weiterführenden immunhistochemischen Analysen (*LC-3, p62* etc.) an den Muskelbiopsien durchgeführt werden konnten.

Führt man die aktuellen Erkenntnisse der Pathophysiologie der Pompe Erkrankung zusammen ist davon auszugehen, dass eine Kombinationstherapie aus klassischer Enzymersatztherapie (ERT) und GAA-Gentherapie bzw. Autophagiebehandlung ein bestmögliches Outcome der Pompe Patienten ermöglicht (Schoser et al. 2019).

### **5.3 Korrelation Muskelpathologie - klinischer Phänotyp bei LOPD Patienten**

In unserer Studie wurde der Muskelscore mit dem Alter bei Biopsie, dem Alter bei Symptombeginn, der CK-Elevation und anhand der GAA-Restenzymaktivität untersucht. Eine Korrelation des Scores mit diesen klinischen sowie laborchemischen Parametern zeigte sich dabei nicht. Ebenso konnten wir für die individuelle Krankheitsdauer keinen signifikanten Einfluss auf die vorhandene Muskelpathologie nachweisen.

Die Ergebnisse bestätigen die bei LOPD Patienten vorhandene Variabilität, die sich nicht nur in der klinischen Symptomatik, sondern auch in der Ausprägung der Muskelpathologie zeigt. Die GAA-Restenzymaktivität der analysierten LOPD Patienten lagen im Mittel zwischen 10-30 % des Normwertes. Die Daten der prozentualen GAA-Restenzymaktivität entsprechen der bekannten residualen GAA-Restenzymaktivität bei LOPD Patienten (Schuller, Kornblum et al. 2013). Es ist zu erwähnen, dass die verwendeten GAA-Restenzymaktivitätswerte von den einzelnen Pompe Zentren eigenständig und nicht zentral bestimmt wurden, sodass Messvariationen zwischen den Zentren nicht auszuschließen sind. Hierbei wurden mitunter verschiedene Gewebe und Medien zur Bestimmung der GAA-Restenzymaktivität verwendet. Neben der Durchführung eines Trockenbluttestes (DBS), der Messung an kultivierten Fibroblasten wurde die GAA-Restenzymaktivität auch anhand entnommener Muskelbiopsien bestimmt.

Morbus Pompe Patienten zeigen häufig im Rahmen des Muskelfaseruntergangs eine HyperCKämie (Lim, Li et al. 2014). In unserer Studie konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der Creatinkinase (CK) und der Höhe der Muskelpathologie

dokumentiert werden. Die vorliegende Variabilität der gemessenen CK-Werte ist neben einem individuellen Krankheitsstadium, einem medikamentös-toxischen Einfluss, auch mit einer möglichen Altersabhängigkeit des Enzyms zu erklären (Dörner 2009).

#### **5.4 Korrelation Muskelpathologie - Genotyp bei LOPD Patienten**

Einen Schwerpunkt in der vorliegenden Studie bildete die Korrelation der Muskelpathologie mit dem individuellen Genotyp.

Morbus Pompe wird compound heterozygot vererbt, sodass immer zwei pathogene Mutationen auf dem Chromosom 17 der Patienten zu finden sind. Als häufigste Mutation (94,6 %) zeigte sich bei 37 LOPD Patienten auf dem 1. Allel die Splice Site Mutation -32-13T>G. Diese Mutation ist auch in bisherigen Studien als häufigste Mutation bei LOPD Patienten zu finden (Kroos et al. 2004, Savarese et al. 2018) und bestätigt eine Normverteilung im Genotyp unserer Kohorte. Als häufigste Allelkombination traten die Splice Site Mutation -32-13T>G (1. Allel) und die Deletionsmutation c.525delT (2. Allel) auf (18,9 %). Die Deletionsmutation ist in der Literatur vor allem bei IOPD Patienten beschrieben worden und ist bei diesen Patienten häufig auf beiden Allelen vorhanden sowie mit einem schweren Krankheitsverlauf verbunden (Pittis et al. 2007). Da bisher keine Untersuchungen zum Vergleich des Genotyps mit dem Muskelphänotyp (Muskelpathologie) vorliegen, waren wir daran interessiert zu untersuchen, ob der Genotyp mit dem ermittelten Muskelscore korreliert.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung haben wir die LOPD Kohorte anhand ihrer Mutationen zunächst in Subgruppen unterteilt und die einzelnen Gruppen danach mit dem Muskelscore sowie dem Alter bei Symptombeginn (disease onset) verglichen. Wir wollten untersuchen, ob Patienten mit Splice Site Mutation (-32-13T>G) im Vergleich zu anderen Patienten signifikante Unterschiede in der Muskelpathologie sowie retrospektiv im Krankheitsbeginn zeigen. Hier zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede, sodass in unserer Studie auch Patienten mit selteneren Mutationen (z.B. c.2242G>T oder c.307T>G) keinen besonderen Muskelphänotyp darstellten.

Die bekannten Mutationsvarianten im GAA-Gen sind in der Rotterdamer Datenbank aufgelistet, wobei die pathogenen Effekte einer Mutation an der noch vorhandenen GAA-Restenzymaktivität bestimmt wurden und als "(potentially) less severe, very severe bzw. unknown" klassifiziert sind (Kroos, Pomponio et al. 2008; Kroos, Hoogeveen-Westerveld et al. 2012). Wir haben daher die einzelnen Allelkombinationen der LOPD Patienten den

in der Rotterdamer Datenbank zugeschriebenen Krankheitseffekten ("(potentially) less severe, very severe bzw. unknown") zugeordnet. Es folgten anhand der Krankheitseffekte Analysen der einzelnen Allelkombinationen mit dem individuellen Muskelscore. In unserer Studie zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Schwere der Muskelpathologie sowie des Alters bei Symptombeginn (disease onset) und den beschriebenen Krankheitseffekten. Zusammenfassend ergab sich keine Korrelation zwischen Muskelpathologie und Genotyp der untersuchten LOPD Patienten. Ergänzt wurden die Untersuchungen durch Korrelation der Allelkombinationen mit der GAA-Restenzymaktivität. Auch in diesen Analysen zeigten die Subgruppen untereinander jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die erhobenen Befunde entsprechen in ihrer Variabilität in histopathologischer Form den bisherigen Analysen des Genotyps mit dem klinischen Phänotyp bei LOPD Patienten. Auch bei anderen compound heterozygot vererbten Erkrankungen sind strikte Genotyp-Phänotyp Korrelationen bisher nicht eindeutig herzuleiten. So zeigen Patienten mit einer zystischen Fibrose (Mukoviszidose) bei identischem Genotyp ähnlich wie Morbus Pompe sich teilweise stark unterscheidende Krankheitsverläufe, sodass ein Einfluss epigenetischer Faktoren wahrscheinlich bleibt (Salvatore, Scudiero et al. 2002). Als Beispiele sei unter anderem ein vorliegender Enzym polymorphismus im ACE- bzw. ACTN3-Gen genannt (De Filippi, Saeidi et al. 2014; Baek, Palmer et al. 2016). Die Muskelpathologie mit anderen krankheitsmodifizierenden Faktoren wie dem Enzym polymorphismus im ACE- oder ACTN3-Gen zu korrelieren könnten weitere interessante Analysen in der Zukunft sein. Dies gilt ebenfalls für Korrelationsanalysen der Muskelpathologie bzw. dem klinischen Phänotyp mit Daten zu micro-RNAs. Aktuelle Studien haben bereits die Rolle von micro-RNAs als Biomarker bei Morbus Pompe Patienten untersucht. Bei IOPD sowie LOPD zeigte sich ein erhöhtes Vorkommen von micro-RNAs, die an der Pathophysiologie der Pompe Krankheit (u.a. Autophagie, Atrophie) beteiligt sind. Ein modulierender Einfluss auf die Genexpression ist beschrieben (Carrasco-Rozas et al. 2019). Bei IOPD gelang es diese micro-RNAs mit dem klinischen Phänotyp sowie dem Verhalten unter Enzymersatztherapie (ERT) zu korrelieren. So zeigten sich ein signifikanter Rückgang unter Enzymersatztherapie (ERT) sowie eine verbesserte klinische Symptomatik (Carrasco-Rozas et al. 2019, Tarallo et al. 2019). Die Bestimmung von micro-RNAs scheint somit als Verlaufparameter unter Therapie sowie zur Schweregradabschätzung in Zukunft ein weiterer interessanter Parameter zu sein.

## 5.5 Bewertung eigener Studienergebnisse

Die Studie zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass an der bisher größten Kohorte von LOPD Patienten die Muskelpathologie mit einem eigens dafür entwickelten Score an kleinen fixierten Muskelproben quantifiziert werden konnte. Die Patienten hatten teilweise einen sehr langen Krankheitsverlauf vor Biopsie von bis zu 26 Jahren. Diese Befunde sind bei rückläufiger invasiver Diagnostik selten geworden. Obwohl in vielen Studien die Muskelpathologie bei LOPD untersucht worden ist, sind Korrelationen mit klinischen und genetischen Daten in dieser Form bisher noch nicht gezeigt worden. Die bestehende Enzymersatztherapie (ERT) scheint bei Pompe Patienten einen größeren Einfluss auf akkumuliertes lysosomales Glykogen als auf freies zytoplasmatisches Glykogen zu haben (Schänzer, Kaiser et al. 2017). Wir konnten anhand unserer Daten zeigen, dass bei LOPD Patienten freies zytoplasmatisches Glykogen insbesondere bei fortgeschrittener Erkrankung und gesteigerter Autophagie sowie starkem fibrotischen Umbau zu beobachten war. In erweiterten elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich bei den LOPD Patienten mit hohem Muskelscore ebenfalls eine schwere sarkomere Desorganisation (Kulesa et al. 2019). Bei diesen Patienten würden wir dementsprechend einen zu späten Therapiebeginn und ein schlechtes Ansprechen auf die Enzymersatztherapie (ERT) erwarten. Der Muskelscore könnte damit auch für weitere Therapiestudien zur Bestimmung der Glykogen- und Autophagieclearance nützlich sein und in Zukunft ein wichtiges Tool zur Beurteilung des Therapieerfolges am Skelettmuskel darstellen. Die Höhe der autophagischen Vakuolen (AV) korrelierte in unserer Studie mit der Höhe des Muskelscores. Dies Befunde dokumentieren ebenfalls, dass eine gesteigerte Autophagie insbesondere bei fortgeschrittener Erkrankung vorliegt. Die Suche nach weiteren Biomarkern, die bereits frühzeitige Veränderungen im autophagischen Prozess anzeigen, ist notwendig. In erweiterten Analysen zeigte sich, dass u.a. anti-Bcl2-associated athanogene 3 (BAG3) vor allem in frühen Krankheitsstadien bei LOPD Patienten zu finden ist (Kulesa et al. 2019). Wir konnten an der größten Kohorte von LOPD Patienten die aktuelle Studienlage zur fehlenden Genotyp-Phänotyp Korrelation auch in Bezug auf den Muskelphänotyp bestätigen. Unsere Daten zeigen abschließend, dass Therapieentscheidungen für LOPD Patienten allein anhand einer Genotyp-Bestimmung schwierig sind und Screening Untersuchungen aufgrund der hohen Heterogenität der Muskelpathologie und eines zusammenfassend ungewissen Krankheitsverlaufs weiterhin kritisch zu sehen sind.

## 6 Zusammenfassung

Morbus Pompe ist eine autosomal-rezessive Erkrankung, bei der das Vorliegen von pathogenen Mutationen im Alpha-1,4-Glucosidase-Gen (*GAA*) zu einem Defekt der lysosomalen alpha-Glucosidase führt. Es zeigten sich insbesondere in der quergestreiften Muskulatur eine pathologische lysosomale und extralysosomale Glykogenakkumulation sowie im Krankheitsverlauf eine Zerstörung der Muskelfaserarchitektur samt Funktionsverlust der Muskelzellen.

Klinisch können IOPD (infantile onset Pompe disease) und LOPD (late onset Pompe disease) unterschieden werden. Während IOPD Patienten häufig aufgrund einer nahezu vollständig fehlenden Restenzymaktivität in den ersten Lebensmonaten schwere Krankheitsverläufe zeigen, liegen bei LOPD Patienten sehr variable Krankheitsverläufe vor. Eine in der vorliegenden Studie durchgeführte Analyse des Genotyps, des klinischen Phänotyps sowie der vorhandenen Muskelpathologie ist bisher noch nicht erfolgt. Die in unserer Studie analysierte Muskelpathologie an der bisher größten publizierten Kohorte von LOPD (n=53) zeigte eine hohe Variabilität, doch waren die Muskelveränderungen bei moderater Glykogenakkumulation im Vergleich zu bisher untersuchten IOPD Patienten insgesamt eher gering ausgeprägt. Diese Befunde korrelieren gut mit der ca. 10-30 % höheren *GAA*-Restenzymaktivität bei LOPD. In unserer Studie gelang eine Quantifizierung der Muskelpathologie mittels Muskelscore, wobei die wichtige Funktion der Autophagie bei vor allem fortgeschrittener Pompe Erkrankung dokumentiert werden konnte. Unter dem Aspekt, dass das in einigen Ländern etablierte Neugeborenen Screening auch LOPD Patienten miterfasst und strikte Genotyp - Phänotyp Korrelationen bisher fehlen, hat uns im Besonderen die Korrelation der Muskelpathologie mit dem individuellen Genotyp der LOPD Patienten interessiert. Die Verteilung des Genotyps mit der häufigsten Splice Site Mutation c.-32-12T>G entsprach den bisher bekannten Mutationsfrequenzen bei LOPD Patienten. Anhand der genetischen Daten von 37 LOPD Patienten konnten wir in unserer Arbeit abschließend keine Korrelation zwischen dem individuellen Genotyp und der vorliegenden Muskelpathologie aufzeigen. Der Einfluss weiterer krankheitsmodifizierender Faktoren (u.a. ACE- oder ein ACTN3-Gen Polymorphismus) ist daher wahrscheinlich. Daher sollten weitere Studien ausführlich nach epigenetischen, autophagischen sowie metabolischen Mechanismen suchen, um verbesserte Therapieoptionen bei LOPD Patienten zu entwickeln.

## 7 Summary

Pompe disease is an autosomal recessive disease in which the presence of pathogenic mutations in the alpha-1,4-glucosidase (GAA) gene leads to a defect in lysosomal alpha-glucosidase. Especially in the striated musculature a pathological lysosomal and extralysosomal glycogen accumulation is observed as well as in the course of the disease a destruction of the muscle fibre architecture including loss of function of the muscle cells.

Clinically, IOPD (infantile onset pompe disease) and LOPD (late onset pompe disease) can be differentiated. While IOPD patients often show severe disease progressions in the first months of life due to an almost complete lack of restenzyme activity, LOPD patients have very variable disease progressions. An analysis of the genotype, the clinical phenotype and the existing muscle pathology has not yet been performed. The muscle pathology analysed in our study, on the largest published cohort of LOPD (n=53) to date, showed a high variability, but was rather low in moderate glycogen accumulation compared to previously investigated IOPD patients. Findings that correlate with the approximately 10-30 % higher GAA residual enzyme activity in LOPD. Our study succeeded in quantifying the muscle pathology by means of a muscle score, whereby the important function of autophagy in advanced Pompe disease could be documented. Under the aspect that the newborn screening established in some countries also includes LOPD patients and strict genotype - phenotype correlations are missing so far, we were particularly interested in the correlation of muscle pathology with the individual genotype of LOPD patients. The distribution of the genotype with the most common Splice Site Mutation c.-32-12T>G corresponded to previously known mutations in LOPD patients. Based on the genetic data of 37 LOPD patients we could not show a correlation between the individual genotype and the muscle pathology. The influence of other disease-modifying factors (e.g. ACE or ACTN gene polymorphism) is therefore likely. Therefore, further studies should look for epigenetic, autophagic, and metabolic mechanisms to develop improved treatment options in LOPD patients.

## **8 Abkürzungsverzeichnis**

AAV - adeno-assoziiertes Virusvektor

ACE – angiotensin converting enzyme

ACP - Acid Phosphatase; saure Phosphatase

ACTN3 – alpha actinin 3

AMFA - isosterische Analoga von Mannose-6-Phosphat in der anomeren Position

AV- autophagische Vakuolen

BAG 3 - anti-Bcl2-associated athanogene 3

BiPAP - bilevel positive airway pressure

CK – Creatinkinase

DBT – dry blood test; Trockenbluttest

ERT – Enzyersatztherapie

Glc4 - Tetra-Saccharidglucose

IGF-1 - insulin like growth factor-1

IOPD –infantile onset Pompe disease

y – years; J - Jahre

LC3 - Microtubule-associated protein light chain 3

LS – potentially less severe

LEV – large empty vacuoles

LOPD- late onset Pompe disease

MBB - Musculus biceps brachialis

MBF - Musculus biceps femoris

MD - Musculus deltoideus

MF - Muskelfaser

MP - Musculus pectineus

MQF - Musculus quadriceps femoris

MTA - Musculus tibialis anterior

MRF - Musculus rectus femoris

MRT - Magnetresonanztomographie

mTOR - mechanistic target of rapamycin

MVL - Musculus vastus lateralis

M6P - Mannose 6 Phosphat

NBS – newborn screening; Neugeborenenenscreening

PAS – Periodic acid Schiff reaction

PPD – p-phenyldiamine

*rh-GAA* - rekombinante humane alpha-Glucosidase; glucosidase alpha, acid

SD - Semidünnschnitt

U/L - Units pro Liter

## 9 Literaturverzeichnis

- Al-Hassnan ZN, Khalifa OA, et al. (2018). The phenotype, genotype, and outcome of infantile-onset Pompe disease in 18 Saudi patients. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* Volume 15, June 2018, Pages 50-54
- Alejaldre A, Diaz-Manera J, et al. (2012). Trunk muscle involvement in late-onset Pompe disease: study of thirty patients. *Neuromuscul Disord* 22 Suppl 2: S148-154. doi 10.1016/j.nmd.2012.05.011
- Amalfitano A, Bengur AR, et al. (2001). Recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: results of a phase I/II clinical trial. *Genet Med* 3(2): 132-138. doi 10.109700125817-200103000-00007
- Angelini C and Semplicini C (2012). Enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 12(1): 70-75. doi 10.1007/s11910-011-0236-5
- Baek RC, Palmer R, et al. (2016). The influence of a polymorphism in the gene encoding angiotensin converting enzyme (ACE) on treatment outcomes in late-onset Pompe patients receiving alglucosidase alfa. *Mol Genet Metab Rep* 8: 48-50. doi 10.1016/j.ymgmr.2016.07.005
- Basile I, Da Silva A, et al. (2018). Efficient therapy for refractory Pompe disease by mannose 6-phosphate analogue grafting on acid alpha-glucosidase. *J Control Release* 269: 15-23. doi 10.1016/j.jconrel.2017.10.043
- Bobillo Lobato J, Jiménez Hidalgo M, et al. (2016). Biomarkers in Lysosomal Storage Diseases. *Diseases* 4(4). doi 10.3390/diseases4040040
- Bodamer OA, Scott CR, et al. (2017). Newborn Screening for Pompe Disease. *Pediatrics* 140(Suppl 1): S4-s13. doi 10.1542/peds.2016-0280C
- Bond JE, Kishnani PS, et al. (2017). Immunomodulatory, liver depot gene therapy for Pompe disease. *Cell Immunol*. doi 10.1016/j.cellimm.2017.12.011
- Byrne BJ, et al. (2019). Pompe disease gene therapy: neural manifestations require consideration of CNS directed therapy. *Ann Transl Med*. 2019 Jul;7(13):290. doi: 10.21037/atm.2019.05.56
- Carrasco-Rozas A, et al. (2019). Identification of serum microRNAs as potential biomarkers in Pompe disease. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019 Jul, 6(7):1214-1224. doi: 10.1002/acn3.50800
- Cardone M, Porto C, et al. (2008). Abnormal mannose-6-phosphate receptor trafficking impairs recombinant alpha-glucosidase uptake in Pompe disease fibroblasts. *Pathogenetics* 1(1): 6. doi 10.1186/1755-8417-1-6
- Chen MA, Weinstein, David A. (2016). Glycogen storage diseases: Diagnosis, treatment and outcome. *Translational Science of Rare Diseases* 1: 45-72. doi 10.3233/TRD-160006
- Chien YH, Chiang SC, et al. (2008). Early detection of Pompe disease by newborn screening is feasible: results from the Taiwan screening program. *Pediatrics* 122(1): e39-45. doi 10.1542/peds.2007-2222
- Chien YH, Lee NC, et al. (2011). Later-onset Pompe disease: early detection and early treatment initiation enabled by newborn screening. *J Pediatr* 158(6): 1023-1027.e1021. doi 10.1016/j.jpeds.2010.11.053
- Chien YH, Lee NC, et al. (2009). Pompe disease in infants: improving the prognosis by newborn screening and early treatment. *Pediatrics* 124(6): e1116-1125. doi 10.1542/peds.2008-3667

- Crescimanno G, Modica R, et al. (2015). Role of the cardio-pulmonary exercise test and six-minute walking test in the evaluation of exercise performance in patients with late-onset Pompe disease. *Neuromuscul Disord* 25(7): 542-547. doi 10.1016/j.nmd.2015.03.010
- De Filippi P, Saeidi K, et al. (2014). Genotype-phenotype correlation in Pompe disease, a step forward. *Orphanet J Rare Dis* 9: 102. doi 10.1186/s13023-014-0102-z
- de la Mata M, Cotán D, et al. (2016). Mitochondrial Dysfunction in Lysosomal Storage Disorders. *Diseases* 4(4). doi 10.3390/diseases4040031
- Dörner K (2009) *Klinische Chemie und Hämatologie*.
- Engel AG, Gomez MR, et al. (1973). The spectrum and diagnosis of acid maltase deficiency. *Neurology* 23(1): 95-106
- Feeney EJ, Austin S, et al. (2014). The value of muscle biopsies in Pompe disease: identifying lipofuscin inclusions in juvenile- and adult-onset patients. *Acta Neuropathol Commun* 2: 2. doi 10.1186/2051-5960-2-2
- Ferreira CR and Gahl WA (2017). Lysosomal storage diseases. *Transl Sci Rare Dis* 2(1-2): 1-71. doi 10.3233/trd-160005
- Figueroa-Bonaparte S, Llauger J et al. (2018). Quantitative muscle MRI to follow up late onset Pompe patient: a prospective study
- Fukuda T, Ewan L, et al. (2006). Dysfunction of endocytic and autophagic pathways in a lysosomal storage disease. *Ann Neurol* 59(4): 700-708. doi 10.1002/ana.20807
- Golsari A, Nasimzadah A, et al. (2018). Prevalence of adult Pompe disease in patients with proximal myopathic syndrome and undiagnosed muscle biopsy. *Neuromuscul Disord* 28(3): 257-261. doi 10.1016/j.nmd.2017.12.001
- Gutierrez-Rivas E, Bautista J, et al. (2015). Targeted screening for the detection of Pompe disease in patients with unclassified limb-girdle muscular dystrophy or asymptomatic hyperCKemia using dried blood: A Spanish cohort. *Neuromuscul Disord* 25(7): 548-553. doi 10.1016/j.nmd.2015.04.008
- Hagemans ML, Winkel LP, et al. (2005). Clinical manifestation and natural course of late-onset Pompe's disease in 54 Dutch patients. *Brain* 128(Pt 3): 671-677. doi 10.1093/brain/awh384
- Hahn A, Praetorius S, et al. (2015). Outcome of patients with classical infantile pompe disease receiving enzyme replacement therapy in Germany. *JIMD Rep* 20: 65-75. doi 10.1007/8904\_2014\_392
- Hahn A, Schänzer A, et al (2019). Long-term outcome and unmet needs in infantile-onset Pompe disease. *Ann Transl Med* 2019; 7 (13):283. doi.10.21037/atm.2019.04.70
- Han SO, Ronzitti G, et al. (2017). Low-Dose Liver-Targeted Gene Therapy for Pompe Disease Enhances Therapeutic Efficacy of ERT via Immune Tolerance Induction. *Mol Ther Methods Clin Dev* 4: 126-136. doi 10.1016/j.omtm.2016.12.010
- Hers HG (1963). alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogenstorage disease (Pompe's disease). *Biochem J* 86: 11-16
- Hirschhorn RRAJJ (2001). <Glycogen\_Storage\_Disease\_Type\_2\_\_Acid\_alpha-Glucosidase\_\_Acid\_Maltase\_\_Deficiency\_chapter135-1.pdf>. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 3389-3420
- Hobson-Webb LD, Proia AD, et al. (2012). Autopsy findings in late-onset Pompe disease: a case report and systematic review of the literature. *Mol Genet Metab* 106(4): 462-469. doi 10.1016/j.ymgme.2012.05.007
- Hoffmann GF (2013). *Stoffwechselerkrankungen. Pädiatrie*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg [https://doi.org/10.1007/978-3-642-24269-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-24269-1_5): (pp. 71-109)

- Hordeaux J, et al. (2017). Long-term neurologic and cardiac correction by intrathecal gene therapy in Pompe disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2017 Sep 6;5(1):66. doi: 10.1186/s40478-017-0464-2
- Hundsberger T, Hohl R, et al. (2010). Die Glykogenose Typ II (Morbus Pompe). *Schweizer Archiv für Neurologie und Psychiatrie* 2010;161(2):55-9
- Khan AA, Boggs T, et al. (2019). Whole-body magnetic resonance imaging in late-onset Pompe disease: Clinical utility and correlation with functional measures. *J Inherit Metab Dis.* doi: 10.1002/jimd.12190
- Kishnani PS, Beckemeyer AA, et al. (2012). The new era of Pompe disease: advances in the detection, understanding of the phenotypic spectrum, pathophysiology, and management. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 160c(1): 1-7. doi 10.1002/ajmg.c.31324
- Kishnani PS, Nicolino M, et al. (2006). Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid alpha-glucosidase in infantile-onset Pompe disease. *J Pediatr* 149(1): 89-97. doi 10.1016/j.jpeds.2006.02.035
- Kishnani P, Chien YH, et al. (2015). The Pompe Registry: 10 Years of Data. *J Neuromuscul Dis* 2(s1): S22-s23
- Klein F (2016). CK-Wert-Erhöhung als „Red Flag“. *InFo Neurologie und Psychiatrie*
- Kroos M, Hoogeveen-Westerveld M, et al. (2012). The genotype-phenotype correlation in Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 160c(1): 59-68. doi 10.1002/ajmg.c.31318
- Kroos M, Pomponio RJ, et al. (2008). Update of the Pompe disease mutation database with 107 sequence variants and a format for severity rating. *Hum Mutat* 29(6): E13-26. doi 10.1002/humu.20745
- Kulesa M, et al. (2019). An integrative correlation of myopathology, pheno-, and genotype in late onset Pompe disease. *Neuropath Appl Neurobiol.* 2019 Sep 23. doi: 10.1111/nan.12580
- Laplante M and Sabatini DM (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149(2): 274-293. doi 10.1016/j.cell.2012.03.017
- Lee DH, Qiu WJ, et al. (2014). Hypertrophic cardiomyopathy in pompe disease is not limited to the classic infantile-onset phenotype. *JIMD Rep* 17: 71-75. doi 10.1007/8904\_2014\_339
- Leslie N and Bailey L (1993) Pompe Disease. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA et al (eds) *GeneReviews*(R). University of Washington, Seattle  
University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved., Seattle (WA).
- Lewandowska E, Wierzba-Bobrowicz T, et al. (2008). Pathology of skeletal muscle cells in adult-onset glycogenosis type II (Pompe disease): ultrastructural study. *Folia Neuropathol* 46(2): 123-133
- Lim JA, Li L, et al. (2014). Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again. *Front Aging Neurosci* 6: 177. doi 10.3389/fnagi.2014.00177
- Lim JA, Li L, et al. (2017). Modulation of mTOR signaling as a strategy for the treatment of Pompe disease. *EMBO Mol Med* 9(3): 353-370. doi 10.15252/emmm.201606547
- Lim JA, et al. (2019). Pros and cons of different ways to address dysfunctional autophagy in Pompe disease. *Ann Transl Med.* 2019 Jul;7(13):279. doi: 10.21037/atm.2019.03.51
- Lollert A, Stihl C, et al. (2018). Quantification of intramuscular fat in patients with late-onset Pompe disease by conventional magnetic resonance imaging for the long-

- term follow-up of enzyme replacement therapy. *PLoS One* 13(1). doi 10.1371/journal.pone.0190784
- Loscher WN, Huemer M, et al. (2018). Pompe disease in Austria: clinical, genetic and epidemiological aspects. *J Neurol* 265(1): 159-164. doi 10.1007/s00415-017-8686-6
- Malicdan MC and Nishino I (2012). Autophagy in lysosomal myopathies. *Brain Pathol* 22(1): 82-88. doi 10.1111/j.1750-3639.2011.00543.x
- Masat E, Laforet P, et al. (2016). Long-term exposure to Myozyme results in a decrease of anti-drug antibodies in late-onset Pompe disease patients. *Sci Rep* 6: 36182. doi 10.1038/srep36182
- Montagnese F, Barca E, et al. (2015). Clinical and molecular aspects of 30 patients with late-onset Pompe disease (LOPD): unusual features and response to treatment. *J Neurol* 262(4): 968-978. doi 10.1007/s00415-015-7664-0
- Muller-Felber W, Horvath R, et al. (2007). Late onset Pompe disease: clinical and neurophysiological spectrum of 38 patients including long-term follow-up in 18 patients. *Neuromuscul Disord* 17(9-10): 698-706. doi 10.1016/j.nmd.2007.06.002
- Musumeci O, la Marca G, et al. (2016). LOPED study: looking for an early diagnosis in a late-onset Pompe disease high-risk population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87(1): 5-11. doi 10.1136/jnnp-2014-310164
- Nascimbeni AC, Fanin M, et al. (2012). The role of autophagy in the pathogenesis of glycogen storage disease type II (GSDII). *Cell Death Differ* 19(10): 1698-1708. doi 10.1038/cdd.2012.52
- Nascimbeni AC, Fanin M, et al. (2015). Impaired autophagy affects acid alpha-glucosidase processing and enzyme replacement therapy efficacy in late-onset glycogen storage disease type II. *Neuropathol Appl Neurobiol* 41(5): 672-675. doi 10.1111/nan.12214
- Pena LD, Proia AD, et al. (2015). Postmortem Findings and Clinical Correlates in Individuals with Infantile-Onset Pompe Disease. *JIMD Rep* 23: 45-54. doi 10.1007/8904\_2015\_426
- Peng SSF, Hwu WL, et al. (2016). Slow, progressive myopathy in neonatally treated patients with infantile-onset Pompe disease: a muscle magnetic resonance imaging study. *Orphanet J Rare Dis* 11. doi 10.1186/s13023-016-0446-7
- Prater SN, Banugaria SG, et al. (2012). The emerging phenotype of long-term survivors with infantile Pompe disease. *Genet Med* 14(9): 800-810. doi 10.1038/gim.2012.44
- Raben N, Hill V, et al. (2008). Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Hum Mol Genet* 17(24): 3897-3908. doi 10.1093/hmg/ddn292
- Raben N, Schreiner C, et al. (2010). Suppression of autophagy permits successful enzyme replacement therapy in a lysosomal storage disorder--murine Pompe disease. *Autophagy* 6(8): 1078-1089. doi 10.4161/auto.6.8.13378
- Ripolone M, Violano R, et al. (2017). Effects of short-to-long term enzyme replacement therapy (ERT) on skeletal muscle tissue in late onset Pompe disease (LOPD). *Neuropathol Appl Neurobiol*. doi 10.1111/nan.12414
- Salvatore F, Scudiero O, et al. (2002). Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J Med Genet* 111(1): 88-95. doi 10.1002/ajmg.10461
- Savarese M, Torella A, et al. (2018). Targeted gene panel screening is an effective tool to identify undiagnosed late onset Pompe disease. *Neuromuscul Disord* 28(7): 586-591. doi 10.1016/j.nmd.2018.03.011

- Schaaf GJ, Canabino-Fraile R, et al. (2019). Restoring the regenerative balance in neuromuscular disorders: satellite cell activation as therapeutic target in Pompe disease. *Ann Transl Med* 2019;7 (13):290 doi.10.21037/atm.2019.04.48
- Schänzer A, Giese K, et al. (2017). Letter to the Editors: Concerning "Divergent clinical outcomes of alpha-glucosidase enzyme replacement therapy in two siblings with infantile-onset Pompe disease treated in the symptomatic or pre-symptomatic state" by Takashi et al. and Letter to the Editors by Ortolano et al. *Mol Genet Metab Rep* 12: 33-34. doi 10.1016/j.ymgmr.2017.05.005 [doi] S2214-4269(17)30065-4 [pii]
- Schänzer A, Gorlach J, et al. (2019). Severe distal muscle involvement and mild sensory neuropathy in a boy with infantile onset Pompe disease treated with enzyme replacement therapy for 6 years. *Neuromuscul Disord.* doi 10.1016/j.nmd.2019.03.004
- Schänzer A, Kaiser AK, et al. (2017). Quantification of muscle pathology in infantile Pompe disease. *Neuromuscul Disord* 27(2): 141-152. doi 10.1016/j.nmd.2016.10.010
- Schänzer A, Rupp S, et al. (2018). Dysregulated autophagy in restrictive cardiomyopathy due to Pro209Leu mutation in BAG3. *Mol Genet Metab* 123(3): 388-399. doi 10.1016/j.ymgme.2018.01.001
- Schoser S, et al. (2019). Pompe disease: what are we missing? *Ann Transl Med* 2019;7 (13): 292.doi 10.21037/atm.2019.05.29
- Schoser BG, Muller-Hocker J, et al. (2007). Adult-onset glycogen storage disease type 2: clinico-pathological phenotype revisited. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33(5): 544-559. doi 10.1111/j.1365-2990.2007.00839.x
- Schuller A, Kornblum C, et al. (2013). [Diagnosis and therapy of late onset Pompe disease]. *Nervenarzt* 84(12): 1467-1472. doi 10.1007/s00115-013-3947-9
- Schuller A, Wenninger S, et al. (2012). Toward deconstructing the phenotype of late-onset Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 160c(1): 80-88. doi 10.1002/ajmg.c.31322
- Tarallo A, et al. (2019). microRNAs as biomarkers in Pompe disease. *Genet Med.* 2019 Mar;21(3):591-600. doi: 10.1038/s41436-018-0103-8
- Thurberg BL, Lynch Maloney C, et al. (2006). Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab Invest* 86(12): 1208-1220. doi 10.1038/labinvest.3700484
- Toscano A and Schoser B (2013). Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe disease: a systematic literature review. *J Neurol* 260(4): 951-959. doi 10.1007/s00415-012-6636-x
- Tsuburaya RS, Monma K, et al. (2012). Acid phosphatase-positive globular inclusions is a good diagnostic marker for two patients with adult-onset Pompe disease lacking disease specific pathology. *Neuromuscul Disord* 22(5): 389-393. doi 10.1016/j.nmd.2011.11.003
- van Capelle CI, van der Meijden JC, et al. (2016). Childhood Pompe disease: clinical spectrum and genotype in 31 patients. *Orphanet J Rare Dis* 11(1): 65. doi 10.1186/s13023-016-0442-y
- van Creveld S and van der Linde HM (1939). Cardiomegalia glycogenica circumscripta. *Arch Dis Child* 14(77): 14-21
- Van den Hout H, Reuser AJ, et al. (2000). Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. *Lancet* 356(9227): 397-398

- Van den Hout JM, Kamphoven JH, et al. (2004). Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from milk. *Pediatrics* 113(5): e448-457
- Van den Hout JM, Reuser AJ, et al. (2001). Enzyme therapy for pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk. *J Inherit Metab Dis* 24(2): 266-274
- van der Ploeg A, Carlier PG, et al. (2016). Prospective exploratory muscle biopsy, imaging, and functional assessment in patients with late-onset Pompe disease treated with alglucosidase alfa: The EMBASSY Study. *Mol Genet Metab* 119(1-2): 115-123. doi 10.1016/j.ymgme.2016.05.013
- van der Ploeg AT and Reuser AJ (2008). Pompe's disease. *Lancet* 372(9646): 1342-1353. doi 10.1016/s0140-6736(08)61555-x
- Vill K, Schessl J, et al. (2015). Muscle ultrasound in classic infantile and adult Pompe disease: a useful screening tool in adults but not in infants. *Neuromuscul Disord* 25(2): 120-126. doi 10.1016/j.nmd.2014.09.016
- Vissing J, Lukacs Z, et al. (2013). Diagnosis of Pompe disease: muscle biopsy vs blood-based assays. *JAMA Neurol* 70(7): 923-927. doi 10.1001/2013.jamaneurol.486
- Wens SC, van Gelder CM, et al. (2013). Phenotypical variation within 22 families with Pompe disease. *Orphanet J Rare Dis* 8: 182. doi 10.1186/1750-1172-8-182
- Werneck LC, Lorenzoni PJ, et al. (2013). Muscle biopsy in Pompe disease. *Arq Neuropsiquiatr* 71(5): 284-289
- Winkel LP, Kamphoven JH, et al. (2003). Morphological changes in muscle tissue of patients with infantile Pompe's disease receiving enzyme replacement therapy. *Muscle Nerve* 27(6): 743-751. doi 10.1002/mus.10381
- Winkel LP, Van den Hout JM, et al. (2004). Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe's disease: a three-year follow-up. *Ann Neurol* 55(4): 495-502. doi 10.1002/ana.20019
- Zirin J, Nieuwenhuis J, et al. (2013). Role of autophagy in glycogen breakdown and its relevance to chloroquine myopathy. *PLoS Biol* 11(11): e1001708. doi 10.1371/journal.pbio.1001708

## 10 Publikationsverzeichnis

Schänzer A, Kaiser A-K, Mühlfeld C, Kulesa M, Paulus W, von Pein H, u. a. (2017).

**Quantification of muscle pathology in infantile Pompe disease.** Neuromuscul Disord NMD. Februar 2017;27(2):141–52.

Martin Kulesa, Cornelia Kornblum, Benedikt Schoser, Kristl Claeys, Ursula Ploeckinger, Stefan Vielhaber, Joachim Weis, Werner Stenzel, Marcus Deschauer, Anne Schänzer (2015). **Morphometrische Untersuchung der pathologischen Veränderungen von Muskelbiopsien von Patienten mit Morbus Pompe im Erwachsenenalter (late onset Pompe disease/LOPD).** Posterpräsentation im Rahmen des 22. Kongress des Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V. (DGM), Bochum 18.-20.06.2015), veröffentlicht im Hauptprogramm.

Martin Kulesa, Lara Viergutz, Cornelia Kornblum, Kristl Claeys, Ursula Ploeckinger, Stefan Vielhaber, Christian Mawrin, Joachim Weis, Werner Stenzel, Marcus Deschauer, Dagmar Nolte, Andreas Hahn, Benedikt Schoser, Anne Schänzer (2017). **Genotyp und myopathologischer Phänotyp bei Patienten mit 39 Morbus Pompe im Erwachsenenalter (LOPD).** Vortrag im Rahmen des 23. Kongress des Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V. (DGM), München 2017), publiziert in Nervenheilkunde 2017; 36(01/02).

Martin Kulesa, Iris Weyer-Menkhoff, Lara Viergutz, Cornelia Kornblum, Kristl Claeys, Ilka Schneider, Ursula Ploeckinger, Pete Young, Matthias Boentert, Stefan Vielhaber, Joachim Weis, Werner Stenzel, Marcus Deschauer, Dagmar Nolte, Andreas Hahn, Benedikt Schoser, Anne Schänzer (2019). **An integrative correlation of myopathology, pheno-, and genotype in late onset Pompe disease.** Neuropath Appl Neurobiol. 2019 Sep 23. doi: 10.1111/nan.12580

## **11 Anhang**

### **11.1 Arbeitsplan zur Gewebeerstellung**

1. Gewebefixation mit 6%-igem Glutaraldehyd
2. Gewebeeinbettung mittels 100 Agar Resin Kit
3. Trimmen der hergestellten Epon-Blöcke
4. Herstellung von Semidünnschnitten (ca. 1,5 $\mu$ m) am Reichert-Jung Ultracut E Ultramicrotom
5. PAS-/Richardson-Färbung der Semidünnschnitte bei gleichzeitiger PAS-Färbung der Kontrollschnitte (Lebergewebe).
6. PPD-Färbung der Semidünnschnitte

### **11.2 Gewebefixation**

#### 6%iges Glutaraldehyd für Muskelproben

120.0 ml	25%iges Glutaraldehyd
93.8 ml	0.4 mol Phosphatpuffer

### 11.3 Resin-Gewebeeinbettung (100 Agar Resin Kit)

1.	10 min	0,1 mol	Phosphatpuffer	
2.	2,5 Std.	1 % O S 1:1	mit Phosphatpuffer	
3.	10 min	0,1 mol	Phosphatpuffer	
4.	10 min	0,1 mol	Phosphatpuffer	
5.	10 min	25 %	Ethanol	
6.	10 min	35%	Ethanol	
7.	10 min	50%	Ethanol	
8.	10 min	70%	Ethanol	
9.	10 min	75 %	Ethanol	
10.	10 min	85 %	Ethanol	
11.	10 min	abs.	Ethanol	
12.	20 min	abs.	Ethanol	
13.	20 min	abs.	Ethanol	
14.	20 min	abs.	Propylenoxid	
15.	20 min	Agar	Propylenoxid	1:1
16.	1 Std.	fertiges	Agar	

### 11.4 PAS-Färbung für Semidünnschnitte (1.5 µm)

1. Objektträger auf der Heizplatte bei 58°C vorwärmen	ca. 10 min
2. Richardson-Lösung	6-7 min
3. mit Aqua dest. abspülen	
4. Perjodsäure bei Raumtemperatur	5 min
5. mit Aqua dest. gut abspülen	
6. Schiff'sreagenz	15 min
7. mit Leitungswasser abspülen	
8. in Leitungswasser bläuen	10 min
9. mit Aqua dest. abspülen	
10. bei 58°C auf der Heizplatte trocknen lassen	ca. 1h
11. Roticlear	5-10 min
12. Eindecken mit Rotimount	

### 11.5 PPD- Färbung für Semidünnschnitte (1.5 µm)

1. 1g para-Phenyldiamine in 50ml 100%-Ethanol lösen
2. Lösung filtrieren
3. bei Raumtemperatur inkubieren 54 min
4. In zwei Küvetten mit 100%- Ethanol waschen
5. bei Raumtemperatur trocknen lassen mind. 1 h
6. nach dem Trocknen in Roticlear geben
7. Eindecken mit Rotimount

### 11.6 Richardson-Färbung für Muskel und Nerven

**Lösung A:** 1% Azur A → 1 g auf 100 ml Aqua dest. lösen (ca. 30 min. rühren)

+

**Lösung B:** 1% Methylenblau → 1g di-Natriumtetraborat-decahydrat in 100ml  
Aqua dest. lösen  
→ 1g Methylenblau in 100ml Natriumtetraborat  
Lösen (ca. 30 min rühren)

**Lösung A + B zusammengeben und filtrieren.**

Die Lösung muss ca. 2 Wochen reifen, bis sie verwendet werden kann. Wenn die Lösung reif ist, erkennt man einen goldenen Rand bei der Inkubation der Lösung

### **Färbung**

1. Objektträger auf der Heizplatte bei 58°C vorwärmen ca. 10 min
2. Richardson-Lösung 6-7 min
3. Mit Aqua dest. abspülen
4. Schnitte vor dem Eindecken auf der Heizplatte trocknen ca. 1h
5. Roticlear 5-10 min
6. Mit Rotimount eindecken

## 11.7 Geräte- und Substanzliste

- Reichert-Jung Ultracut E Ultramicrotom (Trimmen)
- Leica EM AC20 Version 16209031 (Semidünnschnitte)
- Lichtmikroskop Nikon Eclipse 80 + „New CAST“(ComputerAssistedStereologyTool)
  
- Agar 100 Resin Kit (Plano; Artikelnr. R1031)
- Azur A (Sigma-Aldrich; Artikelnr. A6270-10G)
- di-Natriumtetraborat- Decahydrat (Carl Roth GmbH; Artikelnr. T880.1)
- Ethanol (Merck; Artikelnr. 32205-1L-M)
- Methylenblau (Merck; Artikelnr. 159270)
- Osmiumtetroxid 500mg (Carl Roth GmbH; Artikelnr. 8371.2) + 25 ml Aquadest
- Para-Phenyldiamine (Sigma-Aldrich; Artikelnr.: P6001-50G)
- Perjodsäure (Carl Roth GmbH; Artikelnr. 3257.1) →0,5g auf 10ml
- Roticlear (Carl Roth GmbH; Artikelnr. A538.5)
- Roti-Mount (Carl Roth GmbH; Artikelnr. HP68.2) - Schiffsreagenz (Merck; Artikelnr. 1.09033.0500)

## Morphometrische Untersuchung der pathologischen Veränderungen von Muskelbiopsien von Patienten mit Morbus Pompe im Erwachsenenalter (late onset Pompe disease/LOPD)

Kulesa M<sup>1</sup>, Kornblum C<sup>2</sup>, Schoser B<sup>3</sup>, Claeys K<sup>4</sup>, Ploeckinger U<sup>5</sup>, Vielhaber S<sup>6</sup>, Weis J<sup>4</sup>, Stenzel W<sup>7</sup>, Deschauer M<sup>8</sup>, Schänzer A<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Neuropathologie, Justus Liebig Universität Gießen, <sup>2</sup> Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsklinikum Bonn, <sup>3</sup> Friedrich Baur Institut, LMU Universität München, <sup>4</sup> Institut für Neuropathologie, Universität RWTH Aachen, <sup>5</sup> Klinik für Innere Medizin, Abteilung Hepatologie, Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen, Charité, Humboldt Universität Berlin, <sup>6</sup> Klinik für Neurologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, <sup>7</sup> Institut für Neuropathologie, Charité, Humboldt Universität Berlin, <sup>8</sup> Neurologische Klinik und Poliklinik, TU München



### Einleitung

Die angeborene Stoffwechselerkrankung Morbus Pompe (Glykogenose Typ II) zählt zur Gruppe der Glykogenspeicherkrankungen. Betroffene Patienten leiden unter einem lysosomalen Enzymdefekt (saure alpha-1,4-Glukosidase), der zu einem gestörten Metabolismus des Glykogens in den Lysosomen führt. Bei Patienten mit späterem Krankheitsbeginn (late-onset) sind vor allem die Zellverbände der Skelettmuskulatur betroffen. Die daraus folgende progrediente intralysosomale Akkumulation des Glykogens führt im Verlauf zu Schädigungen dieser Zellorganellen und schließlich zum zunehmenden Verlust der einzelnen Muskelzellen. In Folge dieser fortschreitenden Myopathie zeigt sich eine variable Ausprägung der klinischen Symptomatik. Die Patienten zeigen häufig in der klinischen Untersuchung eine symmetrische proximale betonte Muskelschwäche, Auffälligkeiten der axialen Muskulatur (Scapula alata, Hyperlordose, Skoliose) und bei Befall der Atemmuskulatur Symptome der ventilatorischen Insuffizienz. Eine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und der Restaktivität des Enzyms ist bekannt. Eine Enzymersatztherapie (ERT) mit Substitution der rekombinanten humanen alpha-Glukosidase (rh-GAA, Aglucosidase-alpha) ist seit dem 2006 in Deutschland zugelassen. Nicht alle Patienten zeigen ein gleich gutes Ansprechen auf diese Therapie, weshalb Biomarker zum besseren Therapiemonitoring dringend erforderlich sind. In dieser retrospektiven Studie wurde eine Analyse von Skelettmuskelbiopsien von LOPD-Patienten durchgeführt, bei der die Glykogenablagerungen in den Muskelfasern und die Muskelpathologie mit einem neu etablierten morphologischen Scores quantifiziert wurden. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob diese Methode geeignet ist, die pathologischen Veränderungen der Skelettmuskelbiopsien bei Patienten mit LOPD zu quantifizieren. Die Ergebnisse wurden dann mit den klinischen Daten der Patienten, insbesondere mit dem Ansprechen auf die ERT verglichen, um festzustellen, ob der Grad der Muskelpathologie mit dem Ansprechen auf die ERT korreliert.

### Material und Methoden

In dieser Studie wurden Muskelbiopsien von 30 Patienten mit LOPD und 10 Kontrollfällen mit zwei unterschiedlichen Methoden mit Hilfe eines Computer gestützten Verfahren analysiert. Die Patientengruppe umfasste 15 männliche Patienten im durchschnittlichen Alter von 49 Jahren und 15 weibliche Patienten von 44 Jahren. Der größte Anteil der Biopsien (n=18) wurde aus dem Musculus quadriceps femoris entnommen. Aus Glutaraldehydfixiertem, in Kunststoff eingebetteten Gewebe wurden mit PAS gefärbte Semidünnschnitte (SD-PAS) hergestellt. Glykogenablagerungen wurden an Hand von PAS positiven Ablagerungen im Gewebsschnitt quantitativ ausgewertet. Zusätzlich wurden die pathologischen Veränderungen der Muskelfasern mit einem neu etablierten morphologischen Score (Fig. 1) quantifiziert. Die statistischen Auswertungen erfolgten unter Prüfung der Ergebnisse mit Hilfe des Mann Whitney Tests. Es wurde jeweils der Median anhand der vorliegenden Daten bestimmt. Die erhobenen Daten wurden darüber hinaus mit klinischen Parametern korreliert, insbesondere mit dem Ansprechen auf die ERT (recombinant human alpha-glucosidase, 20 mg/kgKG alle 2 Wochen i.v.). Das Ansprechen auf die Therapie wurde als gut, mittel und schlecht abhängig von der motorischen Entwicklung eingestuft.

### 1. Score/Patient

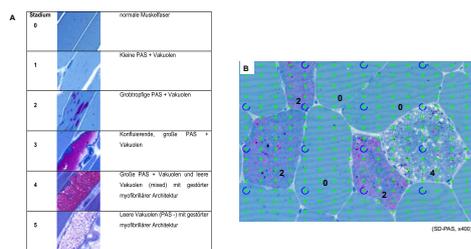


Figure 1 (A) Definition der einzelnen Stadien je nach Ausprägung der Muskelpathologie. Der ermittelte Score/Patient setzt sich in der Summe aus den prozentualen Anteilen der einzelnen pathologischen Stadien zusammen. Je höher der Score/Patient, desto stärker die Ausprägung der vorliegenden Muskelpathologie. (B) Beispiel eines PAS gefärbten Semidünnschnittes (SD-PAS) einer Muskelbiopsie eines Patienten mit LOPD. Neben einzelnen normalen Muskelfasern (Stadium 0) sind Muskelfasern mit pathologischen Veränderungen zu erkennen (Stadium 2, Stadium 4). Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines Kreuztasters (256-Knoepe pro Bild; 400-fache Vergrößerung).

### 2. Geschlechterverteilung der Patienten in Abhängigkeit vom Alter bei Biopsie

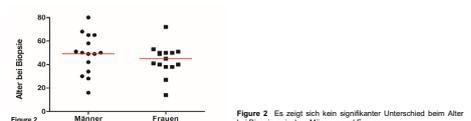


Figure 2. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied beim Alter bei Biopsie zwischen Männern und Frauen.

### Ergebnisse

#### 1. Glykogenakkumulation und Muskelpathologie (Score/Patient) bei Patienten mit LOPD im Vergleich zu Kontrollfällen

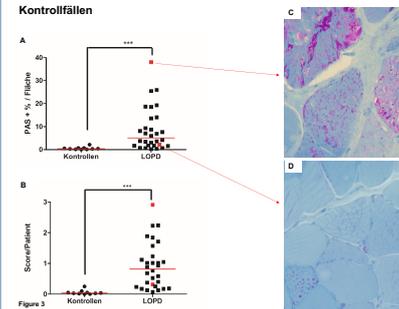


Figure 3 Patienten mit LOPD zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere Glykogenablagerungen im Muskelgewebe (A) und einen signifikant erhöhten Score/Patient (B). Auffällig ist die hohe Variabilität der Ergebnisse bei Patienten mit LOPD, welche gut vereinbar ist mit der hohen Variabilität des klinischen Phänotyps (\*\*\*) (p<0,0001). Als Beispiel ein LOPD Patient mit viel Glykogenablagerungen (=38,11%) und einem hohen Score (=2,91) (C) sowie ein LOPD Patient mit geringen Glykogenablagerungen (=2,14%) und einem niedrigen Score (=0,32). (SD-PAS x400)

#### 2. Glykogenakkumulation und Muskelpathologie (Score/Patient) unter Berücksichtigung des Alters der Patienten bei Biopsie

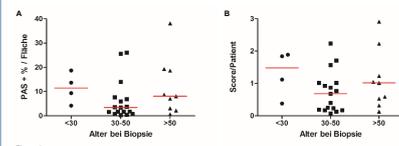


Figure 4 Die Patienten wurden in 3 Altersgruppen unterteilt, um zu untersuchen, ob sich Unterschiede von Glykogenablagerungen und Score/Patient zwischen den Altersgruppen ergeben. Die größte Altersgruppe entspricht den 30-50 Jahren. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Glykogenablagerungen (A) oder dem Score (B) zwischen den Altersgruppen.

#### 3. Glykogenakkumulation und Muskelpathologie (Score/Patient) unter Berücksichtigung des klinischen Verlaufs unter ERT

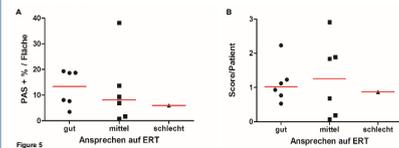


Figure 5 Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Höhe der Glykogenablagerungen (A) sowie dem Score/Patient (B) zwischen den Gruppen mit unterschiedlichem Ansprechen auf die ERT.

#### 4. Zeitpunkt der Biopsie und 6 min Gehstest unter Berücksichtigung des klinischen Verlaufs unter ERT

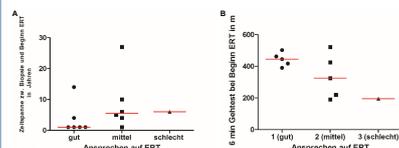


Figure 6 Es zeigt sich keine Abhängigkeit bezüglich der Länge des Zeitraumes zwischen Biopsieentnahme und Therapiebeginn und dem Ansprechen auf die ERT im Verlauf (A). Eine Abhängigkeit zwischen der Gehstrecke beim 6 min Gehstest und dem Ansprechen auf die ERT besteht ebenfalls nicht (B).

### Diskussion

Patienten mit Morbus Pompe zeigen sehr variablen klinischen Verlauf sowie ein unterschiedlich gutes Ansprechen auf die ERT. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob die Quantifizierung der Muskelpathologie als ein Biomarker geeignet ist, das Ansprechen auf die ERT zu beurteilen.

Mit einem neu etablierten Score können die pathologischen Veränderungen der Muskelbiopsie quantifiziert und so mit klinischen Parametern korreliert werden. Wir konnten zeigen, dass Patienten mit LOPD im Vergleich zu Kontrollen signifikant mehr Glykogenablagerungen sowie einen höheren Score/Patient haben, wobei sich eine sehr variable Ausprägung von Glykogenablagerungen und dem Score/Patient zeigt. Diese Werte sind nicht abhängig von dem Alter bei Biopsie und Geschlecht des Patienten. Die Daten wurden retrospektiv erhoben, so dass in einigen Fällen die Biopsie lange zurückliegt (von wenigen Monaten bis zu 27 Jahren) während die ERT erst seit 2006 für LOPD Patienten etabliert ist. Die bisher erhobenen Ergebnisse zeigen allerdings, dass sich keine Abhängigkeit des klinischen Ansprechens auf die ERT von der Zeitspanne zwischen Biopsieentnahme und Beginn der ERT zeigt. Es lagen zur Zeit der Datenanalyse die klinischen Befunde von nur 13 Patienten vor. Diese Daten zeigen, dass Patienten mit gutem oder mittlerem Ansprechen auf die ERT keinen signifikanten Unterschied in der Muskelpathologie oder den Glykogenablagerungen aufweisen. Es gibt nur einen Patienten mit schlechtem Ansprechen, so dass Korrelationen mit dieser Gruppe noch nicht möglich sind. Zudem wurde möglicherweise nicht immer der am schwersten betroffene Muskel biopsiert.

Um zu untersuchen, ob bei einer größeren Anzahl von untersuchten Patienten ein signifikanter Unterschied zwischen dem unterschiedlichen Ansprechen auf die ERT besteht soll die Patientengruppe vergrößert werden. Darüber hinaus sollen die erhobenen Daten der Muskelbiopsien zusätzlich mit anderen Parametern wie genetische Befunde oder CK-Werten korreliert werden.

Mit freundlicher Unterstützung von genzyme A SANOFI COMPANY

## An integrative correlation of myopathology, phenotype and genotype in late onset Pompe disease

M. Kulesa\*, I. Weyer-Menkhoff†, L. Viergutz\*, C. Kornblum‡§, K. G. Claeys¶\*\*, I. Schneider††, U. Plöckinger‡‡, P. Young§§§§, M. Boentert§§, S. Vielhaber¶¶, C. Mawrin\*\*\* , M. Bergmann†††, J. Weis‡‡‡, A. Ziagaki‡‡, W. Stenzel§§§ , M. Deschauer¶¶¶, D. Nolte\*\*\*\*, A. Hahn††††, B. Schoser‡‡‡‡ and A. Schänzer\* 

\*Institute of Neuropathology, Justus Liebig University, Giessen, †Institute of Clinical Pharmacology, Goethe University, Frankfurt/Main, ‡Department of Neurology, §Center for Rare Diseases, University Hospital Bonn, Bonn, Germany, ¶Department of Neurology, University Hospital Leuven, \*\*Laboratory for Muscle Diseases and Neuropathies, Department of Neurosciences, KU Leuven, Leuven, Belgium, ††Department of Neurology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle, ‡‡Interdisciplinary Centre of Metabolism: Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Charité-University Medicine Berlin, Berlin, §§Department of Sleep Medicine and Neuromuscular Disorders, Muenster University Hospital, Münster, ¶¶Department of Neurology, \*\*\*Institute of Neuropathology, Otto-von-Guericke University, Magdeburg, †††Institute of Clinical Neuropathology, Klinikum Bremen-Mitte, Bremen, ‡‡‡Institute of Neuropathology, RWTH University Hospital, Aachen, §§§Department of Neuropathology, Charité – Universitätsmedizin, Berlin, ¶¶¶Department of Neurology, Technical University of Munich, Munich, \*\*\*\*Institute of Human Genetics, ††††Department of Child Neurology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, ‡‡‡‡Department of Neurology, Friedrich-Baur-Institute, LMU University Munich, Munich, Germany and §§§§Medical Park Reithofpark, Bad Feilnbach, Germany

M. Kulesa, I. Weyer-Menkhoff, L. Viergutz, C. Kornblum, K. G. Claeys, I. Schneider, U. Plöckinger, P. Young, M. Boentert, S. Vielhaber, C. Mawrin, M. Bergmann, J. Weis, A. Ziagaki, W. Stenzel, M. Deschauer, D. Nolte, A. Hahn, B. Schoser and A. Schänzer (2019) *Neuropathology and Applied Neurobiology*

### An integrative correlation of myopathology, phenotype and genotype in late onset Pompe disease

**Aims:** Pompe disease is caused by pathogenic mutations in the alpha 1,4-glucosidase (GAA) gene and in patients with late onset Pompe disease (LOPD), genotype–phenotype correlations are unpredictable. Skeletal muscle pathology includes glycogen accumulation and altered autophagy of various degrees. A correlation of the muscle morphology with clinical features and the genetic background in GAA may contribute to the understanding of the phenotypic variability. **Methods:** Muscle biopsies taken before enzyme replacement therapy were analysed from 53 patients with LOPD. On resin sections, glycogen accumulation, fibrosis, autophagic vacuoles and the degree of muscle damage (morphology-score) were analysed and the results were

compared with clinical findings. Additional autophagy markers microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, p62 and Bcl2-associated athanogene 3 were analysed on cryosections from 22 LOPD biopsies. **Results:** The myopathology showed a high variability with, in most patients, a moderate glycogen accumulation and a low morphology-score. High morphology-scores were associated with increased fibrosis and autophagy highlighting the role of autophagy in severe stages of skeletal muscle damage. The morphology-score did not correlate with the patient's age at biopsy, disease duration, nor with the residual GAA enzyme activity or creatine-kinase levels. In 37 patients with LOPD, genetic analysis identified the most frequent mutation, c.-32-13T>G, in 95%, most commonly in combination with c.525delT (19%). No significant correlation was found between the different GAA genotypes and muscle morphology type. **Conclusions:**

Correspondence: Anne Schänzer, Institute of Neuropathology, Arndstr.16, 35392 Giessen, Germany. Tel: 0049 641-9941184; Fax: 0049 99641-41189; E-mail: anne.schaenzer@patho.med.uni-giessen.de

Muscle morphology in LOPD patients shows a high variability with, in most cases, moderate pathology.

Increased pathology is associated with more fibrosis and autophagy.

Keywords: autophagy, GAA, genotype, GSD II, late onset Pompe disease (LOPD), lysosomal storage disease

## Introduction

Pompe disease (OMIM 232300) is an autosomal recessive disease caused by a defect in the lysosomal alpha glucosidase due to bi-allelic pathogenic mutations in the alpha 1,4-glucosidase gene (*GAA*). *GAA* is located on chromosome 17q25.2–25.3 and contains 20 exons resulting in a protein of 952 amino acids [1]. Nowadays, more than 500 variants of mutations in *GAA* are known, which are listed at the Pompe Disease Mutation Databank (<http://www.pompevariantdatabase.nl/>) and are associated with a severity ranking by determining *GAA* enzyme activity [2–4]. However, the clinical phenotypes associated with most of the pathogenic variants show a high variability without clear genotype-phenotype correlation, which makes prediction of the disease outcome difficult [2–9].

Infants with infantile onset Pompe disease (IOPD) are associated with pathogenic variants, e.g. c.525delT, c.2481+102\_2646+13del, that affect both alleles severely, resulting in near absence of *GAA* enzyme activity (<1%), an age of onset below 12 months, hypertrophic cardiomyopathy and poor outcome, at least in the patients not treated with enzyme replacement therapy (ERT) in time [10–14].

In individuals with late onset Pompe disease (LOPD), the pathogenic variant c.32-13T>G is the most common and is associated with a milder phenotype [9,11,12,15]. In German LOPD patients, the c.-32-13T>G mutation is also the most common. The missense mutations c.307T>G and c.877G>A are more common in German patients than in the other European patients [16–18]. In individuals with LOPD, treatment with ERT reduces muscle weakness, respiratory insufficiency and mortality [19,20]. The *GAA* enzyme defect leads to lysosomal and extra-lysosomal accumulation of glycogen in striated muscles with disorganization of myofibrillar architecture and loss of function of the muscle cell [17,21–23]. In addition, disturbed autophagy contributes to the muscle pathology and autophagic vacuoles (AV) are frequently present in

muscle biopsies from patients with Pompe disease [21,24–29]. ERT leads to glycogen clearance in skeletal muscle from the individuals with IOPD and LOPD. Nevertheless, severely abnormal microscopic findings in skeletal muscle at the start of therapy are associated with a worse clinical outcome [21,22,29,30]. Also, muscle pathology can progress even on ERT, a phenomenon, which is not well understood. The aim of the present study was to analyse the muscle morphology of 53 patients with LOPD in detail and compare these findings with the clinical data. Histopathological changes were correlated with individual genotypes in 37 patients. To our knowledge, this is the largest cohort of detailed muscle biopsy analysis in LOPD, and individual correlation of detailed muscle morphology with the *GAA* genotype has not been described before.

## Materials and methods

### Patients

Patients with LOPD who underwent a muscle biopsy were included in this study. In all 53 patients, a muscle biopsy was taken for diagnostic purposes before ERT was started. Muscle biopsy location was chosen based on the clinical presentation of the myopathy (Table S1). The diagnosis of Pompe disease was confirmed by a reduction in *GAA* enzyme activity and/or genetic testing. We included all available muscle biopsy tissue samples from confirmed Pompe patients through the German Neuromuscular centre network. The patients have been seen and examined at different Pompe centres in Germany and resin embedded muscle tissue and cryosections were provided from the associated laboratories. Clinical data were collected retrospectively. Data on enzyme activity levels were available in 26 patients with samples derived from either dried blood spot or muscle tissue. The *GAA* enzyme activity levels were stated as the percentage of normal values. The *GAA* mutations were available for 37 patients and expected effects were categorized according to the

Pompe Disease Mutation Database as potentially mild, severe or unknown phenotype (Table 1) [4]. Clinical data on the duration of symptoms prior to biopsy were available in 30 patients. Serum creatine kinase (CK) at the time of biopsy was available in 39 patients (Table S1).

### Muscle pathology analysis

*Resin sections and transmission electron microscopy* Small samples were taken from open muscle biopsies and fixed in 4% glutaraldehyde/

**Table 1.** Mutations in GAA in 37 patients were matched and ranked according to the Pompe Disease Mutation Database (<http://www.pompevariantdatabase.nl/>)

Patient	Allele 1	Allele 2
P3	c.-32-13T>G	c.525delT
P17	c.-32-13T>G	c.525delT
P24	c.-32-13T>G	c.525delT
P30	c.-32-13T>G	c.525delT
P58	c.-32-13T>G	c.525delT
P51	c.-32-13T>G	c.525delT
P52	c.-32-13T>G	c.525delT
P9	c.-32-13T>G	c.794delG
P10	c.-32-13T>G	c.794delG
P1	c.-32-13T>G	c.1076-1G>A
P8	c.-32-13T>G	c.1548G>A
P13	c.-32-13T>G	c.2078_2079insA
P25	c.-32-13T>G	c.2608C>T
P28	c.-32-13T>G	c.1822
P34	c.-32-13T>G	c.118C>T
P37	c.-32-13T>G	c.2242G>T
P41	c.-32-13T>G	c.271delG
P42	c.-32-13T>G	c.118C>T
P11	c.-32-13T>G	c.1495T>A
P12	c.-32-13T>G	c.307T>G
P15	c.-32-13T>G	c.1655T>C
P16	c.-32-13T>G	c.925G>A
P18	c.-32-13T>G	c.1942G>A
P19	c.-32-13T>G	c.2055C>A
P20	c.-32-13T>G	c.1829C>T
P21	c.-32-13T>G	c.1064T>C
P22	c.-32-13T>G	c.1075 G>A
P32	c.-32-13T>G	c.1655T>C
P36	c.-32-13T>G	c.655G>A
P4	c.-32-13T>G	c.2407C>T
P6	c.-32-13T>G	bp del (IVS16+102_IVS17+31)
P29	c.-32-13T>G	c.1127delGGinsC
P23	c.-32-13T>G	/
P27	c.-32-13T>G	/
P14	c.1655T>C	c.1478C>T
P40	c.1478C>T	/
P53	536bpdel	c.-32-13T>G

Red = severe; blue = mild; grey = unknown clinical phenotype.

© 2019 British Neuropathological Society

0.4MPBS and processed according to standard procedures. One to two  $\mu\text{m}$  semithin sections were cut from resin embedded tissue and stained with Periodic acid-Schiff (PAS) and 2%-p-phenyldiamine (PPD) [21]. Morphometric analysis of glycogen accumulation, large empty vacuoles (LEV) and pathology score were performed on PAS-stained resin sections using a light microscope equipped with a motorized stage and digital camera with newCAST software as described before [21]. In brief, the section was delineated and a point grid containing 256 crosses was projected to each field of view. For estimating glycogen deposits and LEV, the area below the points were graded as PAS positive, PAS negative or LEV and estimated as percentage of total area [%/muscle fibre (MF)]. For estimating the muscle score, area below the points were graded from 0 to 5 according to the previously described criteria (grade 0 = normal, grade 1 = small PAS + vacuoles, grade 2 = medium PAS + vacuoles, grade 3 = larger PAS + vacuoles with myofibrillar disruption, grade 4 = larger PAS + vacuoles and LEV with myofibrillar disruption, grade 5 = LEV with myofibrillar disruption) (Figure S1A–C). A morpho-score was calculated ( $(x\% \text{ grade}0 \times 0) + (x\% \text{ grade}1 \times 1) + (x\% \text{ grade}2 \times 2) + (x\% \text{ grade}3 \times 3) + (x\% \text{ grade}4 \times 4) + (x\% \text{ grade}5 \times 5)/100$  from these findings expressed in grade 1–5 with 0 as lowest grade demonstrating normal morphology [21].

Muscle fibres with AV (vacuoles with dark inclusions) were analysed on PPD stained resin sections as percentage of all MFs. Additionally, the degree of fibrosis was estimated semi-quantitatively on PAS stained resin sections and rated from normal (0) to severe (3) (Table S2). For contrast in transmission electron microscopy (TEM), ultrathin sections were treated with 3% lead citrate-3H<sub>2</sub>O with a Leica EM AC20 (ultrastain kit II, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and examined at a Zeiss EM109 TEM (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) equipped with a sharp eye digital camera.

*Histochemical, immunohistochemical and immunofluorescence microscopy* In a smaller cohort ( $n = 22$ ), unfixed muscle tissue was available for additional enzymatic and immunohistological staining for autophagy and lysosomal markers. Unfixed tissue was snap frozen and 6  $\mu\text{m}$  cryosections were stained for the lysosomal enzyme, acid phosphatase according to

standard procedures [31]. Immunohistochemical analysis was performed on cryosections using a Bench Mark XT automatic staining platform (Ventana, Heidelberg, Germany) with the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) (0231-100/LC3-5F10, nanoTools, 1:100, Teningen, Germany); mouse monoclonal anti-p62 (610832, BD Biosciences, 1:500, Franklin Lakes, NJ, USA). The following primary antibodies were used for immunofluorescence: mouse monoclonal anti-desmin (M076029-2, Agilent, 1:100, Santa Clara, CA, USA); rabbit polyclonal anti-Bcl2-associated athanogene 3 (BAG3) (10599-1-AP, Proteintech, 1:500, Manchester, UK). The secondary antibodies were: Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, 1:100, Carlsbad, CA, USA) and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Life Technologies, 1:500). The sections were mounted with Fluoroshield mounting medium with DAPI (Abcam, Cambridge, UK) and examined using a Nikon Eclipse 80i or Leica DM2000 fluorescence microscopes. The intensity of acid phosphatase staining was estimated semi-quantitatively and rated from normal or absent (0) to strong (4), LC3 and p62 was estimated semi-quantitatively and rated from normal or absent (0) to strong (3). Muscle sections stained with antibodies against desmin and BAG3 were estimated for BAG3 positive inclusions and rated from absent (0) to strong (3).

**Statistics** Correlations between the morphological score and clinical data and autophagy markers were analysed by calculating the Spearman rank correlation coefficient to assess a possible linear association between two variables. To analyse differences between the genetic combination with regard to score, age and GAA enzyme activity Kruskal–Wallis-test was used. Data were analysed using the R software package (version 3.4.3 for Windows; <https://CRAN.R-project.org/>, R Core Team, [51]).

## Results

### Patients

Muscle biopsy specimens from 29 (55%) male, age at biopsy varying between 16–78 years (median 46 year), and 24 (45%) female patients, age at biopsy between

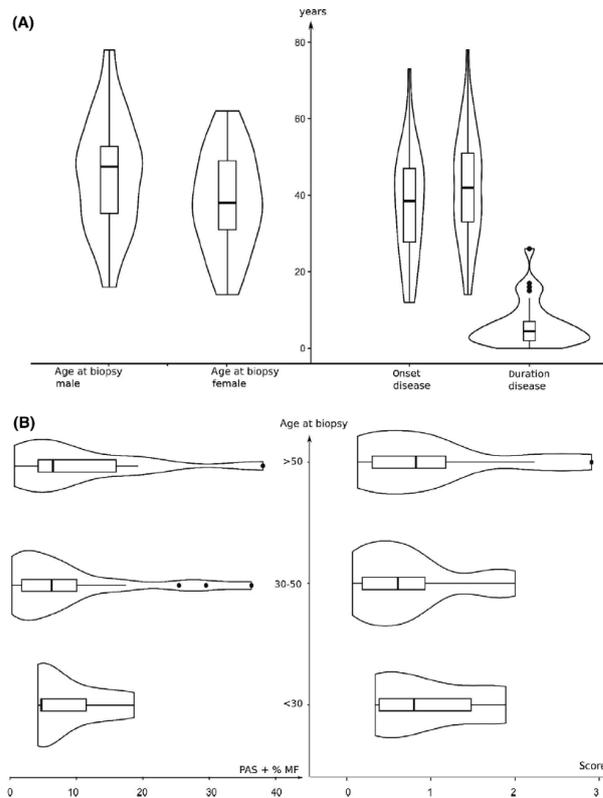
14–72 year (median 42 year), were analysed. The distribution of gender and age in this study was similar to those in other studies [29]. Patients were 14–78 years of age ( $n = 53$ , median 44 year) at time of biopsy, with  $n = 29$  (55%) between 30 and 50 years. Disease onset was at 8–73 years ( $n = 33$ ; median 39 year) with a diagnostic delay to the time of biopsy and disease duration of 0–26 years ( $n = 33$ , median 5 year) (Figure 1A and Table S1).

### Muscle pathology

**Morpho-score** The analysis of the muscle biopsies ( $n = 53$ ) showed high variability in the morpho-score [0.59 (0.07–3.77)], glycogen accumulation [4.73 (0.24–44.62) PAS+ %/MF], LEV [0.06 (0–10.09) LEV%/MF] and AV [ $n = 48$ , 2.68 (0–27.56) AV%/MF]. Forty patients (75%) showed <10% PAS/MF glycogen accumulation and 68% (36/53) a low morpho-score (<1) (Figure 1B and Table S2).

The morpho-score significantly correlated with fibrosis (Spearman's  $\rho = 0.46$ ;  $P = 0.0006$ ) showing remodelling of connective tissue in severe stages. The analysis of AV showed a significant positive correlation with the morpho-score (Spearman's  $\rho = 0.34$ ;  $P = 0.0173$ ), highlighting the role of autophagy during muscle pathology progression. The morpho-score significantly correlated with glycogen accumulation (PAS) (Spearman's  $\rho = 0.86$ ;  $P < 0.0001$ ) and LEV (Spearman's  $\rho = 0.35$ ;  $P = 0.01$ ) as was to be expected since both parameters are included in the morpho-score (Figure 2).

**TEM** Samples with different degrees of pathology were examined at the ultrastructural level. Muscle biopsies with a low morpho-score mainly showed lysosomal glycogen and normal sarcomeric architecture (Figure 3A,C,E). Biopsies with high morpho-scores showed massive lysosomal and non-lysosomal glycogen deposits with sarcomere disorganization (Figure 3B,D,F). Additionally, AV were more prominent in biopsies with high morpho-scores, often accompanied by abnormal mitochondria with increased variation of size and disruption of cristae structure (Figure 4A–F). In many biopsies with low morpho-scores, in addition to lysosomal glycogen, intermyofibrillar glycogen was present (Figure 5A,B). In biopsies with higher scores, extra-lysosomal glycogen surrounding lysosomes was

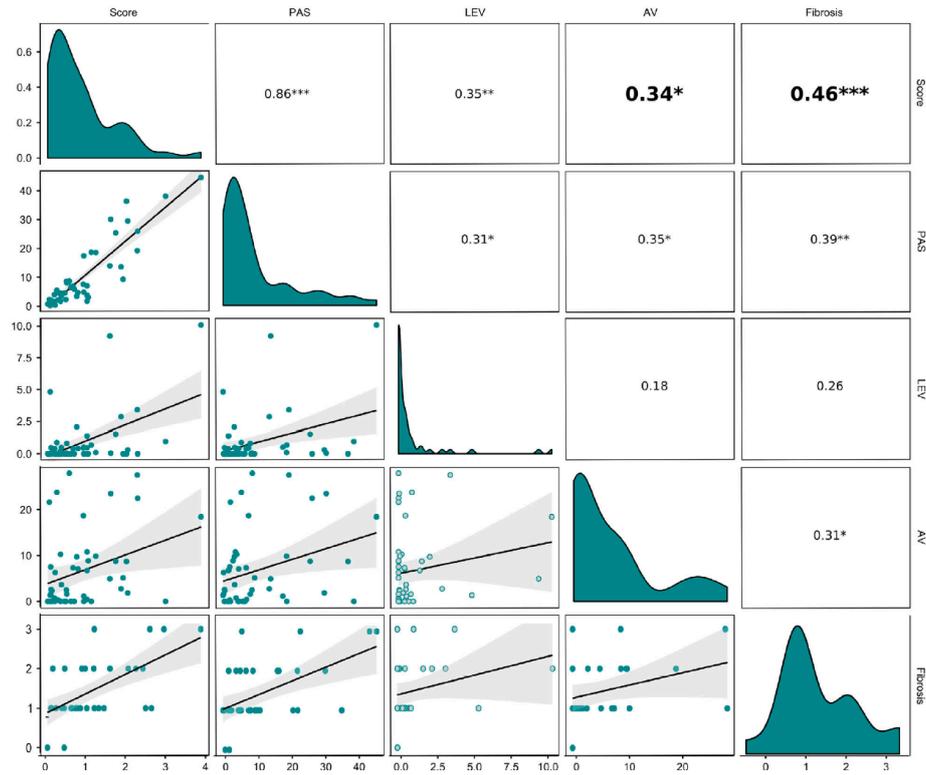


**Figure 1.** Analyses of clinical data compared to muscle morphology. Patients analysed are equally distributed in gender (male 55%) with no difference at age at biopsy. The age at symptom onset varies from 8 to 73 years (median 39 year) and age at biopsy from 14 to 78 years (median 44 year) with a duration of symptoms before biopsy of 0–26 years (median 5 year) (A). The majority of patients are between 30–50 years old and have glycogen accumulation  $< 10$  PAS%/muscle fibre (MF) (75%) and a low morpho-score  $< 1$  (68%) without differences in muscle morphology between different age groups (B). The superimposed box and whisker plots have been constructed using the quartiles and medians (solid horizontal line within the boxes). The lines add 1.5 times the interquartile range (IQR) to the 75th percentile or subtract 1.5 times the IQR from the 25th percentile and are expected to include 99.3% of the data. They are surrounded by violin plots showing the density distribution of the values.

often seen in combination with autophagosomes with double layered membranes and autophagic material (Figure 5C,D).

*Enzymatic staining for acid phosphatase and expression of antibodies against autophagy markers p62, LC3 and BAG3* Staining intensity of acid phosphatase and expression of autophagy markers LC3 and p62 in 22

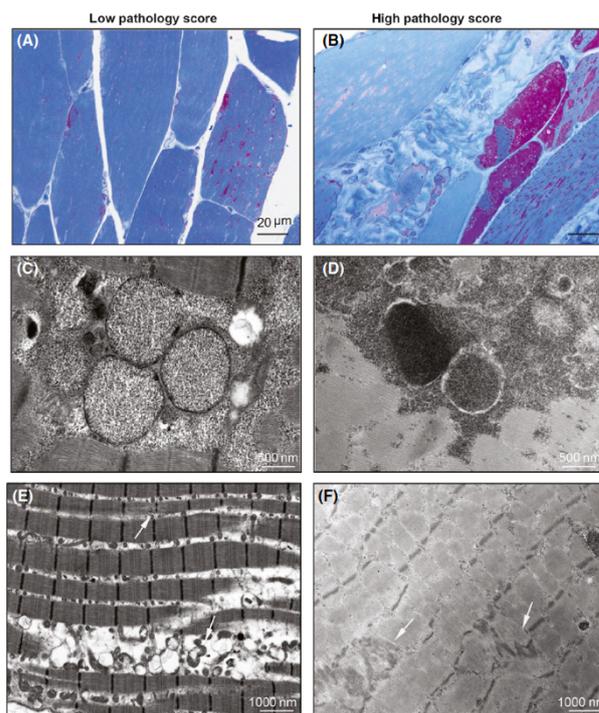
muscle biopsies showed a stronger upregulation in muscle biopsies graded with a higher morpho-score and increased AV. The analysis of the morpho-score showed a significant positive correlation with p62 (Spearman's  $\rho = 0.48$ ;  $P = 0.031$ ) and acid phosphatase (Spearman's  $\rho = 0.70$ ;  $P = 0.0006$ ) compatible with increased autophagy during Pompe disease progression (Figure S2A,B and Table S3).



**Figure 2.** Correlation matrix of morpho-score, glycogen accumulation, large empty vacuoles (LEV), autophagic vacuoles (AV) and fibrosis obtained from the muscle biopsies. For estimating the muscle pathology PAS and 2%-p-phenyldiamine stained resin sections were analysed by a recently established morpho-score. Upper triangular part of the matrix shows the Spearman correlation coefficients (Spearman's rho with significance levels associated to a symbol (P-values: \*\*\*<0.001, \*\*<0.01, \*<0.05) or conditional (split according to levels) boxplots. The distribution of each variable is shown on the diagonal (green). Lower triangular part of the matrix shows the bivariate scatterplots (green) with a fitted line (black) and the confidence interval of the line (grey) or histograms were separated according to levels. The morpho-score significantly correlates with fibrosis and AV showing remodelling of connective tissue and increased autophagy during muscle pathology progression (bold).

Double immunofluorescent staining against Z-band proteins desmin and BAG3 was performed at 22 biopsies. In the majority of biopsies, small BAG3 positive aggregates were present mainly in the core of well-preserved fibres and were increased in biopsies of high p62 and LC3 expression. In comparison, in MFs with large vacuoles (LEV), there was co-expression of desmin and BAG3 in the peripheral area reflecting remnants of Z-band structures and no BAG3 positive inclusions

were detected. At TEM, large autophagosomes were mainly seen in the core of MFs with normal sarcomere structures whereas they were not present in MFs with abundant LEV (Figure S4). These findings suggest that BAG3 plays a role in early, but not late stage in the single MF pathology. Interestingly, one patient (P28) with a high number of AV showed high expression of LC3, p62 and BAG3 consistent with increased autophagy even at a moderate score (0.38) and glycogen



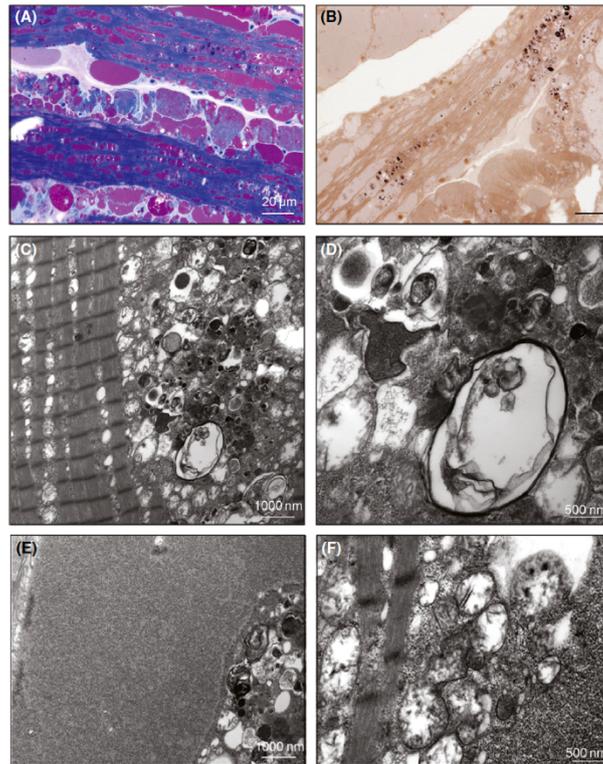
**Figure 3.** Muscle biopsy specimens from two patients with different grade of muscle pathology. P16 demonstrates a low morpho-score of 1.02 with moderate increased spectrum of muscle fibre (MF) diameters without endomysial fibrosis (PAS%/MF = 7.04, LEV = 0.48 and AV = 0.45) (A). On ultrastructural analysis, P16 shows lysosomal glycogen and small extra-lysosomal glycogen deposits (C). The sarcomere architecture is mostly well organized with only a few dispersed Z-bands and marginal mitochondrial pathology with aggregation and deranged cristae (E). P30 shows a high morpho-score of 2.23 with increased MF size variation and pronounced endomysial fibrosis (PAS%/MF = 19.29, LEV%/MF = 3.41 and AV%/MF = 27.56) (D). On ultrastructural analysis, P30 shows lysosomal and extra-lysosomal glycogen (D) with disorganization of the sarcomeric structures with Z-band streaming (F) (A,B: PAS stained resin sections). (PAS, Periodic acid-Schiff; LEV, large empty vacuoles; AV, autophagic vacuoles).

accumulation (4.19%). The biopsy was taken at 14 years of age (the youngest patient in the study) with the *GAA* mutations c.-32-13T>G, c.1822C>T (Figure S3 and Table S3).

**Muscle pathology and clinical findings** The morpho-score showed no significant correlation with the age at biopsy, disease duration (years from first symptoms to biopsy) and *GAA* enzyme activity ( $n = 26$ ), 18% (3.8–39%) ( $P > 0.3$ ) and CK levels [ $n = 39$ , median 536, (96–1767 U/I)] CK levels showed a significant negative

correlation with the age at biopsy (Spearman's  $\rho = -0.54$ ;  $P = 0.0004$ ) (Figure 6).

**Genotype, clinical phenotype and muscle morphology type** In 37 patients, 26 known pathogenic mutations in *GAA* were detected. Among those, the majority (95%) were the common splice site mutation c.-32-13T>G, followed by the deletion mutation c.525delT (19%). Other mutations were c.1655T>C (8%), c.1478C>T (5%), c.118C>T (5%) and c.794delG (5%). The most common combination ( $n = 7$ , 19%) was c.-

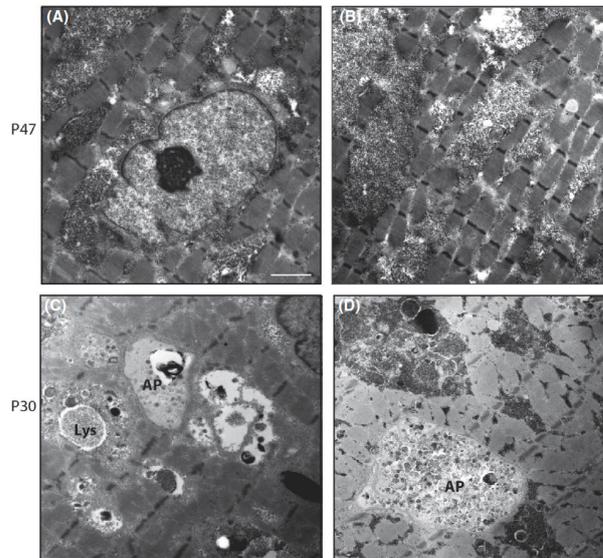


**Figure 4.** Estimation of glycogen accumulation and AV in muscle biopsy specimens from a patient with a high morpho-score. Disturbed autophagy is a hallmark of Pompe disease and AV increase with the morpho-score and glycogen accumulation. On resin sections, autophagy can be estimated by the amount of the AV and LEV. Patient (P2) with a high morpho-score of 3.77 with an abundant glycogen accumulation (PAS%/MF = 44.6%), vacuoles (AV = 18.43, LEV = 10.09), and endomysial fibrosis (grade 2); pronounced muscle pathology and massive glycogen accumulation in PAS-stained sections (A) with prominent AV detectable in PPD stained sections with dark inclusions (B). Transmission electron microscopy shows AV containing myelin-like structured debris (C,D), and are located adjacent to the sarcomeres or massive glycogen deposits (C,E). Mitochondria are focally accumulated and swollen with disrupted internal cristae structures (F). (PAS, Periodic acid-Schiff; LEV, large empty vacuoles; AV, autophagic vacuoles; PPD, p-phenyldiamine).

32-13T>G together with c.525delT. In three patients (8%), only a single mutation on one allele was identified (Figure 7 and Table 1).

We were interested in comparing genotype data to the clinical phenotype and muscle morphology data. Therefore, the mutations in *GAA* were ranked according to the Pompe Disease Mutation Database (<http://www.pompevariantdatabase.nl/>) as 'severe' (very severe mutation), 'mild' (potentially less severe mutation)

or 'unknown' phenotype [2–4]. Applying this ranking clustered the patients into six different groups (score and age shown as medians): patients with two mutations predicted to be 'mild' [ $n = 11$ , score: 0.53 (0.07–2.9),  $n = 9$  age of onset: 43 year (15–73 year)], patients with one mutation predicted to be 'mild' and one to be 'severe' [ $n = 18$ , score 0.70, 0.14–2.23,  $n = 15$ , age of onset, 36 (13–55 year)], patients with one mutation predicted to be 'mild' and one 'unknown'



**Figure 5.** Lysosomal and extra-lysosomal glycogen deposits and autophagosomes at transmission electron microscopy. Muscle biopsy P47 with a moderate score = 1.59 and glycogen accumulation of PAS%/MF = 30.1% shows frequent extra-lysosomal glycogen with no severe disturbance of sarcomeric structures (A,B). Muscle biopsy from P30 with a high score = 2.23 with frequent enlarged glycogen containing lysosomes, extra-lysosomal glycogen and large autophagosomes (C,D) (Lys, lysosome; AP, autophagosome).

[ $n = 3$ , score 0.37 (0.13–1.57),  $n = 3$ , age of onset: 43 year (27–58 year)] and patients with one mutation predicted to be ‘mild’ only [ $n = 2$ , score 1.39 (0.94–1.84), age of onset 22 year (12–32 year)], patient with one ‘unknown’ and one predicted to be ‘mild’ ( $n = 1$ , score 0.71, age of onset 55 year) and ‘unknown’ mutation at one allele ( $n = 1$ , score 0.87, age at onset 49 year) (Table 1 and Figure 7). The ranked means of the allele combinations for morpho-score, disease onset and GAA enzyme levels were equally distributed as the  $p$ -values did not meet statistical significance ( $P > 0.4$ ). In particular, the ranked means of the most common combination of mutation c.-32-13T>G; c.525delT [ $n = 7$ , score 0.94, 0.14–2.23; age of onset: 45 year, (20–55 year)] for score, disease onset and GAA enzyme levels were equally distributed compared to mutation combination c.-32-13T>G and other [ $n = 28$ , score: 0.59 (0.07–2.9),  $n = 22$ , age of onset: 39 year (13–73 year)] and combination non c.-32-13T>G and other [ $n = 3$ , score 0.87 (0.71–1.57),  $n = 2$ , age of onset: 33.5 year (27–40 year)] (Figure 7).

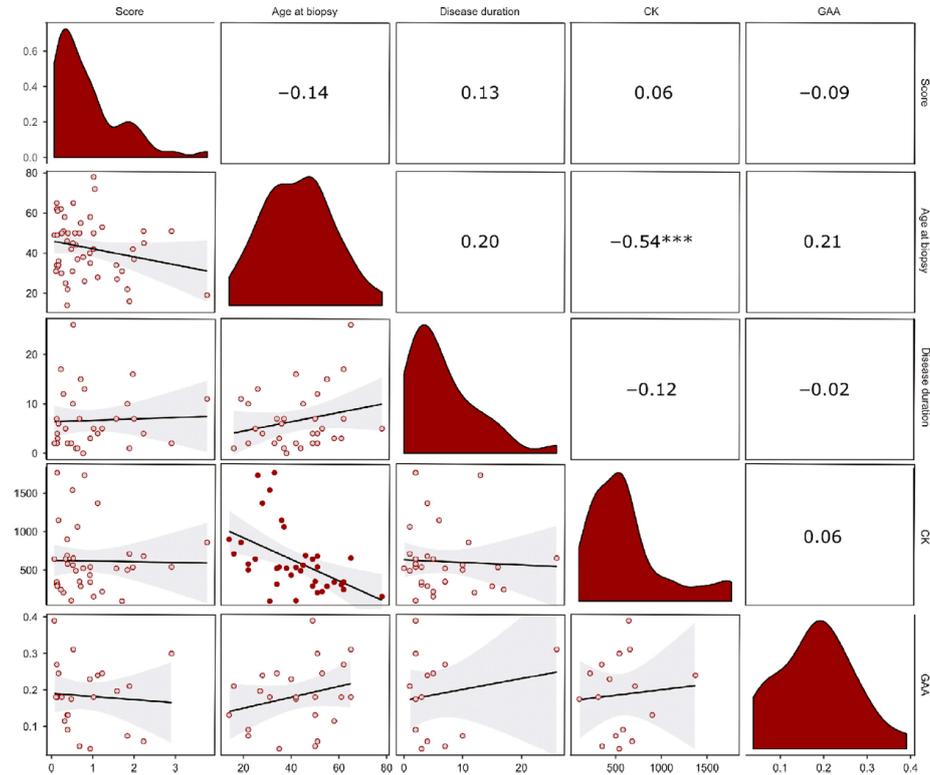
© 2019 British Neuropathological Society

Additionally, no significant differences were detectable analysing the vacuoles (AV or LEV) with respect to the GAA genotype (Figure S5).

## Discussion

Investigation of muscle biopsies gives a great opportunity to analyse disease pathogenesis and may add to the understanding of the broad clinical variability in LOPD. The aim of our study was a detailed analysis of muscle morphology from a large cohort of patients with LOPD before the start of ERT and comparison of these findings to the clinical, laboratory (GAA enzyme activity, CK levels) and pathogenic variants in GAA.

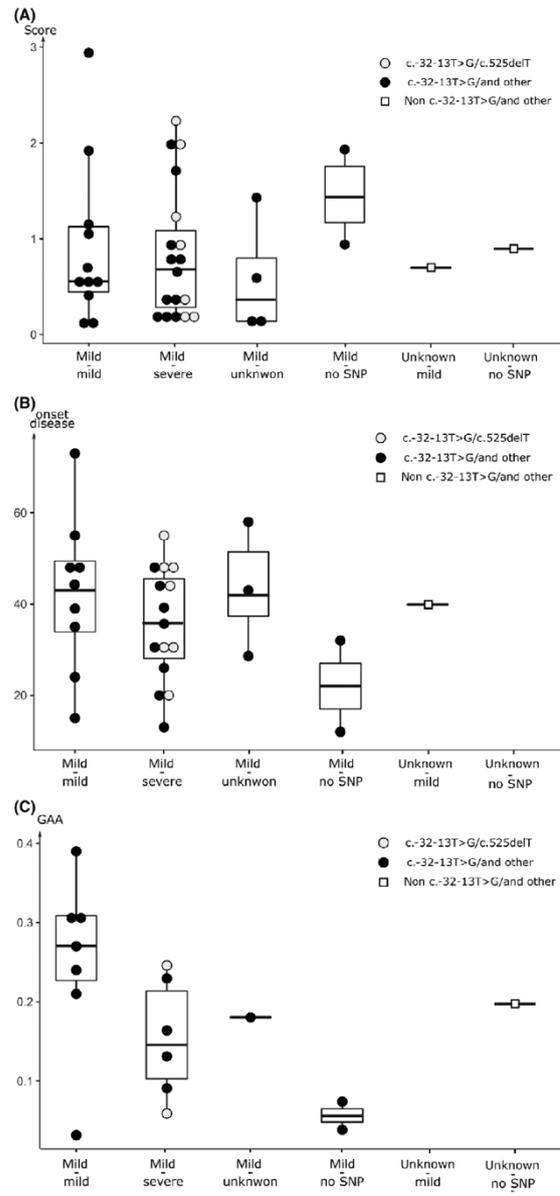
For grading the muscle pathology, we used a morpho-score, which we had already established on resin embedded biopsies from patients with IOPD [21]. The morpho-score includes, in addition to glycogen accumulation, myofibrillar disruption and LEV as a feature of disturbed autophagy. In IOPD patients, a lower score reflecting less pathology is associated with a better



**Figure 6.** Correlation matrix of morpho-score, age at biopsy, disease duration, creatine kinase (CK) and alpha 1,4-glucosidase (GAA) residual enzyme activity obtained from the patients. Upper triangular of the matrix shows the Spearman correlation coefficients (Spearman's  $\rho$ ) with significance levels associated to a symbol ( $P$ -values: \*\*\* $<0.001$ , \*\* $<0.01$ , \* $<0.05$ ). The distribution of each variable is shown on the diagonal (red). Lower triangular part of the matrix shows the bivariate scatterplots (red) with a fitted line (black) and the confidence interval of the line (grey). The morpho-score shows no significant correlation with clinical symptoms and GAA residual enzyme activity, CK levels are significantly negative correlated with the age at biopsy.

response to ERT with recombinant GAA, whereas patients with a high morpho-score have a limited ERT response [21]. The data are in line with other reports showing a worse response to therapy in patients with severely damaged MFs with worse pathology indicating the need for early therapy in patients with minor

**Figure 7.** Analyses of alpha 1,4-glucosidase (GAA) mutations compared to muscle morphology and clinical data. Boxplots of the individual morpho-score to GAA mutation combination. The combinations for each subject are shown as points, and the box and whisker plots show the quartiles and medians (solid horizontal line within the boxes). The whiskers add 1.5 times the interquartile range (IQR) to the 75th percentile or subtract 1.5 times the IQR from the 25th percentile. According to the Pompe Disease Mutation Database, mutations were ranked as mild (potential less severe mutation); severe, (very severe mutation); unknown, (unknown mutation) and no single nucleotide polymorphism (SNP). The global differences between the individual scores to mutation combination did not meet statistical significance ( $P > 0.1$ ). The ranked means of the GAA allele combinations for (A) morpho-score, (B) disease onset and (C) GAA residual enzyme activity are equally distributed.



pathology [30]. But even early therapy does not predict a good clinical outcome in all patients [10,32,33]. However, the underlying reason why the efficiency of therapy is restricted is not fully understood. Here, we translate this morpho-score to the muscle analysis in LOPD. Although, muscle pathology in LOPD patients has been reported earlier, our cohort encompasses the highest number of tissue specimens investigated in detail so far [17,22,23,29]. In our study, LOPD muscle biopsy samples show a high variability in muscle morphology. Interestingly, 75% of the specimens have minor muscle damage with a glycogen accumulation of <10% and a morpho-score below grade 1. On average, the morpho-score is much lower in LOPD compared to IOPD, which shows muscle pathology before the start of ERT with scores up to 4, as expected by a higher residual GAA enzyme activity in LOPD [17,21]. Muscle biopsies from LOPD patients can show a subtle pathology and sometimes are graded as unspecific on PAS stained cryosections [34]. In the present study, although in four patients the morpho-score was low, glycogen containing vacuoles were present in all of them on PAS-stained resin sections.

Treatment with recombinant GAA leads to decreased intra-lysosomal glycogen accumulation [35]. In our study even in muscle biopsy specimens with a low morpho-score, extra-lysosomal glycogen was detectable, but without major disruption of the sarcomeric structure. Whereas high morpho-scores were associated with large extra-lysosomal glycogen deposits and severe sarcomeric disorganization. The morpho-score and glycogen accumulation correlated with increased endomysial fibrosis, informing about severe stages of muscle damage with increased connective tissue replacement. Recently, analyses of glycogen clearance in LOPD muscle samples showed that free extra-lysosomal cytoplasmic glycogen persisted in post-treatment biopsy specimens, suggesting that ERT treatment may have been introduced too late, but neither fibrosis nor sarcomeric disorganisation was described [22].

The age and gender distribution of our cohort reveals a median age of 41 years, 55% of patients were male patients and a diagnostic delay of 5 years, consistent with other reports [9,17,29]. Correlating muscle pathology with disease duration shows that patients with longer disease duration do not have more severe muscle tissue damage. These data underscore the clinical heterogeneity and indicate that additional factors

may contribute to disease progression and severity. Interestingly, serum CK levels were lower in older patients, possibly related to disease associated muscle atrophy.

In mechanically strained striated MFs, autophagy is an important process for normal cell function, and dysfunction of autophagy plays a major role in disease progression in lysosomal myopathies [24,36]. In Pompe disease, autophagy is impaired with autophagic buildup of various degree in both IOPD and LOPD showing large vacuoles and increase of autophagy markers, LC3 and p62, which might accelerate the muscle damage [37–39]. Large vacuoles and large glycogen deposits remain unchanged on ERT treatment, whereas a reduction in glycogen is associated with a reduction in vacuolated fibres [29].

Therapeutic benefits by modifying autophagy in Pompe disease have been demonstrated in several animal models [40–43]. In our study, buildup of autophagy showed a significant positive correlation with the morpho-score and glycogen accumulation, highlighting the role of autophagy in severe stages of LOPD muscle pathology. The autophagic markers, LC3 and p62 correlated with the lysosomal enzyme acid phosphatase and were increased in muscle biopsies with more severe pathology. Tension induced accumulation of proteins in skeletal MFs are degraded by chaperone-assisted selective autophagy in which the co-chaperone BAG3 plays an important role [44]. Interestingly in our study, small BAG3 positive inclusions were present mostly in the core of preserved MFs suggesting that BAG3 is involved in early events and not at late stage pathology. BAG3 has been found to be located inside autophagosomes and triggers the autophagy of ubiquitinated clients [45], which is in line with large autophagosomes found at ultrastructural analysis in MFs in our study. These observations also fit well with autophagic buildup observed in the core of the MFs in GAA mice [37]. The autophagic buildup seems to disrupt sarcomere structure and leads to loss of muscle force rather than buildup of glycogen filled lysosomes [46]. Further studies are necessary to investigate the role of BAG3 in the autophagic process in Pompe disease in more detail.

Countries with new-born screening for Pompe disease are increasing and in addition, to the early genetic diagnosis of IOPD, a large number of mutations in GAA associated with LOPD are being detected and are of an

uncertain clinical outcome [47,48]. Over 500 different pathogenic *GAA* mutations are known and affected individuals show high phenotypic variability despite sharing the same *GAA* mutations, even within a family [3,7,32]. Until now, only a few factors such as angiotensin enzyme polymorphisms have been reported to modify the individual Pompe disease phenotype [5]. The c.-32-13T>G mutation is the most common *GAA* mutation in Europe. In individuals with compound heterozygous mutations, disease manifestation may be highly variable regarding both age of onset and initial symptoms [4,6,7,16,49,50]. In our cohort of 37 German LOPD patients, 95% are compound heterozygous with the c.-32-13T>G mutation on one allele, and show symptom onset at a mean age of 39 years (12–73 year), consistent with published data [4]. The high variability of mutations affecting the second allele, with the most common combination being with c.525delT in 19% in our patients along with several other less common mutations, makes correlative analysis difficult. Our analysis does not show differences in the morpho-score or disease onset between different allele combinations. Therefore, we ranked the phenotype of the mutations according to the Pompe mutation database. We studied different allele combinations to elucidate whether patients with different combinations had distinct clinical features, ages of onset or muscle pathology [2]. The majority of the LOPD patients had a combination of a mild with a severe *GAA* (49%). However, clinical findings and muscle morphology do not relate to the genetic findings in the investigated patient group. Therefore, a genotype–phenotype correlation cannot be defined.

### Conclusion

The detailed analysis of muscle morphology in a large cohort of patients with LOPD reflects high variability of muscle tissue damage. This variability is accompanied by moderate glycogen accumulation and a low morpho-score in most patients. High morpho-scores are associated with increased fibrosis and autophagy. This highlights the role of autophagy in severe stages of muscle tissue damage. Comparing muscle morphology and genetic findings reveals no meaningful genotype–phenotype correlations. This emphasises the putative relevance of yet unknown genetic modifiers independent of the *GAA* mutational spectrum. Transcriptomics,

proteomics and metabolomics studies need to be performed to address these open questions.

### Ethical statement

This work was in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (ethical committee of the University of Giessen; AZ07/09) and with the Helsinki Declaration (1964, amended most recently in 2008) of the World Medical Association and written informed consent was obtained from the patients.

### Acknowledgements

We thank the patients contributing to the study. We thank Angela Roth, Hannah Schlierbach and Kerstin Leib for her excellent technical assistance and the Institute of Neuropathology WWU Muenster, Germany for contributed muscle biopsy samples.

### Author contributions

AS designed the study, analysed data and wrote the manuscript. MK and LV performed morphometric analyses of muscle biopsies and analysed data. CK, KC, UP, PY, MB, IS, MB, CM, SV, JW, MD, AZ, WS, BS contributed muscle biopsy samples, clinical data and reviewed the manuscript. DN and AH assisted with the interpretation of genetic data and IWM with statistical analysis. All authors read and approved the final manuscript.

### Funding

For this analysis unrestricted research funding was given to AS by Sanofi-Aventis Deutschland GmbH.

### Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest in respect of the manuscript contents. The Editors of Neuropathology and Applied Neurobiology are committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. As such, this article was peer-reviewed by independent, anonymous expert referees and the authors (including WS) had no role in either the editorial decision or the handling of the paper.

## References

- 1 Hoefsloot LH, Hoogeveen-Westerveld M, Reuser AJ, Oostra BA. Characterization of the human lysosomal alpha-glucosidase gene. *Biochem J* 1990; 272: 493–7
- 2 Kroos M, Hoogeveen-Westerveld M, Michelakakis H, Pomponio R, Van der Ploeg A, Halley D, et al. Update of the pompe disease mutation database with 60 novel GAA sequence variants and additional studies on the functional effect of 34 previously reported variants. *Hum Mut* 2012; 33: 1161–5
- 3 Kroos M, Hoogeveen-Westerveld M, van der Ploeg A, Reuser AJ. The genotype-phenotype correlation in Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2012; 160: 59–68
- 4 Kroos MA, Pomponio RJ, Hagemans ML, Keulemans JL, Phipps M, DeRiso M, et al. Broad spectrum of Pompe disease in patients with the same c.-32-13T->G haplotype. *Neurology* 2007; 68: 110–5
- 5 De Filippi P, Saeidi K, Ravaglia S, Dardis A, Angelini C, Mongini T, et al. Genotype-phenotype correlation in Pompe disease, a step forward. *Orphanet J Rare Dis* 2014; 9: 102
- 6 Montagnese F, Barca E, Musumeci O, Mondello S, Migliorato A, Ciranni A, et al. Clinical and molecular aspects of 30 patients with late-onset Pompe disease (LOPD): unusual features and response to treatment. *J Neurol* 2015; 262: 968–78
- 7 Wens SC, van Gelder CM, Kruijshaar ME, de Vries JM, van der Beek NA, Reuser AJ, et al. Phenotypical variation within 22 families with Pompe disease. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 182
- 8 Sampaolo S, Esposito T, Farina O, Formicola D, Diodato D, Gianfrancesco F, et al. Distinct disease phenotypes linked to different combinations of GAA mutations in a large late-onset GSDII sibship. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 159
- 9 Löscher WN, Huemer M, Stulnig TM, Simschitz P, Iglseider S, Eggens C, et al. Pompe disease in Austria: clinical, genetic and epidemiological aspects. *J Neurol* 2018; 265: 159–64
- 10 Hahn A, Praetorius S, Karabul N, Diessel J, Schmidt D, Motz R, et al. Outcome of patients with classical infantile pompe disease receiving enzyme replacement therapy in Germany. *JIMD Rep* 2015; 20: 65–75
- 11 Montalvo AL, Bembì B, Donnarumma M, Filocamo M, Parenti G, Rossi M, et al. Mutation profile of the GAA gene in 40 Italian patients with late onset glycogen storage disease type II. *Hum Mut* 2006; 27: 999–1006
- 12 Hirschhorn R, Reuser AJ. Glycogen storage disease type II: acid alpha-glucosidase (acid maltase) deficiency. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Chapter 135. Eds D Valle, O Simell. New York: McGraw-Hill, 2001; 3389–420
- 13 Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, Berger K, Byrne BJ, Case LE, et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med* 2006; 8: 267–88
- 14 van den Hout HM, Hop W, van Diggelen OP, Smeitink JA, Smit GP, Poll-The BT, et al. The natural course of infantile Pompe's disease: 20 original cases compared with 133 cases from the literature. *Pediatrics* 2003; 112: 332–40
- 15 Winkel LP, Hagemans ML, van Doorn PA, Loonen MC, Hop WJ, Reuser AJ, et al. The natural course of non-classic Pompe's disease; a review of 225 published cases. *J Neurol* 2005; 252: 875–84
- 16 Herzog A, Hartung R, Reuser AJ, Hermanns P, Runz H, Karabul N, et al. A cross-sectional single-centre study on the spectrum of Pompe disease, German patients: molecular analysis of the GAA gene, manifestation and genotype-phenotype correlations. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7: 35
- 17 Schoser BG, Müller-Höcker J, Horvath R, Gempel K, Pongratz D, Lochmüller H, et al. Adult-onset glycogen storage disease type 2: clinico-pathological phenotype revisited. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007; 33: 544–59
- 18 Joshi PR, Glaser D, Schmidt S, Vorgerd M, Winterholler M, Eger K, et al. Molecular diagnosis of German patients with late-onset glycogen storage disease type II. *J Inher Metab Dis* 2008; 31 (Suppl. 2): S261–5
- 19 Gungor D, de Vries JM, Hop WC, Reuser AJ, van Doorn PA, van der Ploeg AT, et al. Survival and associated factors in 268 adults with Pompe disease prior to treatment with enzyme replacement therapy. *Orphanet J Rare Dis* 2011; 6: 34
- 20 Toscano A, Schoser B. Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe disease: a systematic literature review. *J Neurol* 2013; 260: 951–9
- 21 Schänzer A, Kaiser AK, Mühlfeld C, Kulessa M, Paulus W, von Pein H, et al. Quantification of muscle pathology in infantile Pompe disease. *Neuromusc Dis* 2017; 27: 141–52
- 22 van der Ploeg A, Carlier PG, Carlier RY, Kissel JT, Schoser B, Wenninger S, et al. Prospective exploratory muscle biopsy, imaging, and functional assessment in patients with late-onset Pompe disease treated with alglucosidase alfa: the EMBASSY Study. *Mol Genet Metabol* 2016; 119: 115–23
- 23 Müller-Felber W, Horvath R, Gempel K, Podskarbi T, Shin Y, Pongratz D, et al. Late onset Pompe disease: clinical and neurophysiological spectrum of 38 patients including long-term follow-up in 18 patients. *Neuromusc Dis* 2007; 17: 698–706
- 24 Malicdan MC, Nishino I. Autophagy in lysosomal myopathies. *Brain Pathol* 2012; 22: 82–8
- 25 Nascimbeni AC, Fanin M, Tasca E, Angelini C, Sandri M. Impaired autophagy affects acid alpha-glucosidase processing and enzyme replacement therapy efficacy in late-onset glycogen storage disease type II. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2015; 41: 672–5
- 26 Raben N, Wong A, Ralston E, Myerowitz R. Autophagy and mitochondria in Pompe disease: nothing is

- so new as what has long been forgotten. *Am J Med Genet* 2012; **160**: 13–21
- 27 Chien YH, Lee NC, Huang PH, Lee WT, Thurberg BL, Hwu WL. Early pathologic changes and responses to treatment in patients with later-onset Pompe disease. *Pediatr Neurol* 2012; **46**: 168–71
  - 28 Feeney EJ, Austin S, Chien YH, Mandel H, Schoser B, Prater S, et al. The value of muscle biopsies in Pompe disease: identifying lipofuscin inclusions in juvenile- and adult-onset patients. *Acta Neuropathol Comm* 2014; **2**: 2
  - 29 Ripolone M, Violano R, Ronchi D, Mondello S, Nascimbeni A, Colombo I, et al. Effects of short-to-long term enzyme replacement therapy (ERT) on skeletal muscle tissue in late onset Pompe disease (LOPD). *Neuropathol Appl Neurobiol* 2018; **44**: 449–62
  - 30 Thurberg BL, Lynch Maloney C, Vaccaro C, Afonso K, Tsai AC, Bossen E, et al. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab Invest* 2006; **86**: 1208–20
  - 31 Dubowitz V, Sewry C, Oldfords A. *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. London: Saunders Elsevier, 2013
  - 32 Schänzer A, Giese K, Viergutz L, Hahn A. Letter to the editors: concerning 'divergent clinical outcomes of alpha-glucosidase enzyme replacement therapy in two siblings with infantile-onset Pompe disease treated in the symptomatic or pre-symptomatic state' by Takashi et al. and Letter to the Editors by Ortolano et al. *Mol Genet Metab Rep* 2017; **12**: 33–4
  - 33 Schänzer A, Görlach J, Claudi K, Hahn A. Severe distal muscle involvement and mild sensory neuropathy in a boy with infantile onset Pompe disease treated with enzyme replacement therapy for 6 years. *Neuromusc Disord* 2019; **29**: 477–82
  - 34 Golsari A, Nasimzadah A, Thomalla G, Keller S, Gerloff C, Magnus T. Prevalence of adult Pompe disease in patients with proximal myopathic syndrome and undiagnosed muscle biopsy. *Neuromusc Dis* 2018; **28**: 257–61
  - 35 Reuser AJ, Van Den Hout H, Bijvoet AG, Kroos MA, Verbeet MP, Van Der Ploeg AT. Enzyme therapy for Pompe disease: from science to industrial enterprise. *Eur J Pediatr* 2002; **161** (Suppl. 1): S106–11
  - 36 Neel BA, Lin Y, Pessin JE. Skeletal muscle autophagy: a new metabolic regulator. *Trends Endocrinol Metabol* 2013; **24**: 635–43
  - 37 Raben N, Hill V, Shea L, Takikita S, Baum R, Mizushima N, et al. Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 3897–908
  - 38 Nascimbeni AC, Fanin M, Masiero E, Angelini C, Sandri M. Impaired autophagy contributes to muscle atrophy in glycogen storage disease type II patients. *Autophagy* 2012; **8**: 1697–700
  - 39 Lim JA, Li L, Raben N. Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again. *Front Aging Neurosci* 2014; **6**: 177
  - 40 Lim JA, Sun B, Puertollano R, Raben N. Therapeutic benefit of autophagy modulation in Pompe disease. *Mol Ther* 2018; **26**: 1783–96
  - 41 Lim JA, Li L, Shirihai OS, Trudeau KM, Puertollano R, Raben N. Modulation of mTOR signaling as a strategy for the treatment of Pompe disease. *EMBO Mol Med* 2017; **9**: 353–70
  - 42 Raben N, Schreiner C, Baum R, Takikita S, Xu S, Xie T, et al. Suppression of autophagy permits successful enzyme replacement therapy in a lysosomal storage disorder—murine Pompe disease. *Autophagy* 2010; **6**: 1078–89
  - 43 Lim J, Meena N, Raben N. Pros and cons of different ways to address dysfunctional autophagy in Pompe disease. *Ann Trans Med* 2019; **7**: 279
  - 44 Ulbricht A, Gehlert S, Leciejewski B, Schiffer T, Bloch W, Höfheld J. Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. *Autophagy* 2015; **11**: 538–46
  - 45 Klimek C, Kathage B, Wordehoff J, Höfheld J. BAG3-mediated proteostasis at a glance. *J Cell Sci* 2017; **130**: 2781–8
  - 46 Xu S, Galperin M, Melvin G, Horowitz R, Raben N, Plotz P, et al. Impaired organization and function of myofilaments in single muscle fibers from a mouse model of Pompe disease. *J Appl Physiol* 2010; **108**: 1383–8
  - 47 Chien YH, Lee NC, Thurberg BL, Chiang SC, Zhang XK, Keutzer J, et al. Pompe disease in infants: improving the prognosis by newborn screening and early treatment. *Pediatrics* 2009; **124**: e1116–25
  - 48 Chien YH, Lee NC, Huang HJ, Thurberg BL, Tsai FJ, Hwu WL. Later-onset Pompe disease: early detection and early treatment initiation enabled by newborn screening. *J Pediatr* 2011; **158**: 1023–7.e1
  - 49 Huie ML, Chen AS, Tsujino S, Shanske S, DiMauro S, Engel AG, et al. Aberrant splicing in adult onset glycogen storage disease type II (GSDII): molecular identification of an IVS1 (-13T->G) mutation in a majority of patients and a novel IVS10 (+1GT->CT) mutation. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 2231–6
  - 50 Johnson K, Topf A, Bertoli M, Phillips L, Claeys KG, Stojanovic VR, et al. Identification of GAA variants through whole exome sequencing targeted to a cohort of 606 patients with unexplained limb-girdle muscle weakness. *Orphanet J Rare Dis* 2017; **12**: 173
  - 51 R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2018. Available at <https://www.R-project.org/>

### Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Figure S1.** For estimating the morpho-score Periodic acid-Schiff (PAS) stained resin sections were graded from 0 to 5: grade 0 = normal, grade 1 = small PAS + vacuoles, grade 2 = medium PAS + vacuoles, grade 3 = larger PAS + vacuoles with myofibrillar disruption, grade 4 = larger PAS + vacuoles and large empty vacuoles (LEV) with myofibrillar disruption, grade 5 = LEV with myofibrillar disruption (A). Muscle sections show muscle fibres with different grading close to each other (B,C). (A–C: PAS stained resin sections, magnification  $\times 400$ ).

**Figure S2.** Staining intensity of acid phosphatase and expression of autophagy markers microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 and p62 in patients with different morpho-scores. Muscle biopsies with a higher morpho-score shows increased expression compared to muscle biopsies with a lower score (A). Correlation matrix of score, Periodic acid-Schiff (PAS), large empty vacuoles (LEV), autophagic vacuoles (AV) and fibrosis obtained from the muscle biopsies. Upper triangular part of the matrix shows the spearman correlation coefficients (Spearman's rho with significance levels associated to a symbol ( $P$ -values: \*\*\* $<0.001$ , \*\* $<0.01$ , \* $<0.05$ ). The distribution of each variable is shown on the diagonal (blue). Lower triangular part of the matrix shows the bivariate scatterplots (blue) with a fitted line (black) and the confidence interval of the line (grey) The morpho-score shows a significant positive correlation with p62 and acid phosphatase compatible with increased autophagy and lysosomal activity during muscle pathology progression (B).

**Figure S3.** With double immunofluorescent staining against Z-band proteins desmin (green) and Bcl2-associated athanogene 3 (BAG3) (red) small BAG3 positive inclusions in the core of muscle fibres (MFs) can be detected mostly in well-preserved MFs and are increased in muscle biopsies with high expression of microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 and p62. In vacuolated fibres sarcomeric remnants

show co-expression of desmin and BAG3 (yellow) and no larger BAG3 positive inclusions.

**Figure S4.** Ultrastructural analysis of muscle biopsies in which immunofluorescence staining against Bcl2-associated athanogene 3 (BAG3) was performed: large autophagosomes are located mainly in the muscle fibre (MF) core. Only focal loss of Z-bands is noted at higher magnification accompanied by swollen microtubules, small vacuoles and intra- and extra-lysosomal glycogen (P53). In single MFs with more severe sarcomere disarray or large areas of glycogen accumulation no increased large autophagosomes are present (P33, P41). Muscle fibres with upregulation of microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 expression show increased numbers of large autophagosomes (P30).

**Figure S5.** Analyses of alpha 1,4-glucosidase (*GAA*) gene mutations compared to muscle morphology and clinical data: Boxplots of the individual morpho-score to *GAA* gene mutation combination. The combinations for each subject are shown as points, and the box and whisker plots show the quartiles and medians (solid horizontal line within the boxes). The whiskers add 1.5 times the interquartile range (IQR) to the 75th percentile or subtract 1.5 times the IQR from the 25th percentile. The global differences between the individual scores to mutation combination did not meet statistical significance ( $P > 0.1$ ). According to the Pompe Disease Mutation Database mutations were ranked as mild (potential less severe mutation); severe, (very severe mutation); unknown, (unknown mutation) and no single nucleotide polymorphism (SNP) (AV, autophagic vacuoles; LEV, large empty vacuoles). No significant differences are detectable analysing the vacuoles (AV or LEV) with respect to the *GAA* genotype.

**Table S1.** Clinical data and genetic background of the patients with late onset Pome disease.

**Table S2.** Morphological data of the patients with late onset Pome disease.

**Table S3.** Analysis of autophagy markers in patients with late onset Pome disease.

Received 21 June 2019

Accepted after revision 7 August 2019

Published online Article Accepted on 23 September 2019

## **14 Danksagung**

Für die Möglichkeit zur Erstellung einer Promotionsarbeit danke ich dem Institut für Neuropathologie in Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Till Acker. Namentlich möchte ich hierbei im Besonderen Frau PD Dr. Anne Schänzer hervorheben und mich ganz herzlich für die rundum hervorragende Betreuung im Rahmen der Erarbeitung der vorliegenden Dissertationsschrift bedanken. Ich danke ebenso allen Mitarbeiterinnen im Institut für die großartige Unterstützung meiner manchmal auch kurzfristigen Anliegen. Besonders möchte ich an dieser Stelle Frau Cornelia Dambmann nennen, die mich auch in schwierigen Zeiten im Labor tatkräftig unterstützt und aufgemuntert hat.

Ich danke ebenso allen Instituten, die Patientendaten sowie Probenmaterial zur Verfügung gestellt haben. Sie bildeten die Grundlage für eine erfolgreiche Durchführung der Studie.

Zuletzt möchte ich meiner Familie (Mama, Papa, Ingo sowie den lieben Großeltern) für die Hilfestellungen in all den Jahren und dem Aushalten meiner unterschiedlichsten Gemütszustände danken. Insbesondere für die Unterstützung im intensiven Endspurt danke ich Ulrike, der Frau an meiner Seite. Ein besonderer Dank an dieser Stelle auch an die größte freundschaftliche Stütze, danke Philipp!

## 15 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

Unterschrift