

Enucleated cell-based transfer of mitochondria for muscle regeneration

Dr. Magda Tyszkiewicz

Lab of Assoc.Prof. Dr. Johannes Grillari, Ludwig Boltzmann Institute for Traumatology, Vienna, Austria

Abstrakt

Die Regeneration dystropher, atrophierter und/oder akut verletzter Muskeln erfordert die Erforschung neuartiger therapeutischer Strategien, um eine schnellere und effizientere Genesung im Vergleich zu traditionellen Verfahren zu ermöglichen. Derzeit basiert die Behandlung von Muskelverletzungen auf pharmakologischen Ansätzen – einschließlich nicht-steroidaler Antirheumatika und Kortikosteroide zur Schmerz- und Entzündungsreduktion – zusammen mit dem „RICE“-Prinzip (Ruhe, Eis (Kälte), Kompression und Hochlagerung)¹. Auf diese folgen Rehabilitationsprogramme, die auf den spezifischen Fall zugeschnitten sind. Da traditionelle Behandlungen bei Muskeltraumata und Muskelerkrankungen oft unzureichend sind, stellt die Entwicklung fortschrittlicher Therapien einen kritischer Faktor zur Bewältigung dieses unerfüllten klinischen Bedarfs dar^{2,3}.

Mitochondrien sind die Basis für Muskelfunktionalität, da sie der Hauptenergielieferant des Muskels unter aeroben Bedingungen sind. Dessen Effizienz besonders während der regenerativen Myogenese ist entscheidend, um einen hohen Energiebedarf zur Aufrechterhaltung einer ordnungsgemäßen Muskelbildung zu gewährleisten. Unter pathologischen Bedingungen sind Muskelzellen jedoch nicht in der Lage, die Mitochondrienfunktionalität und -dynamik aufrechtzuerhalten. Zu den Pathologien, die mit Skelettmuskelanomalien aufgrund mitochondrialer Dysfunktion einhergehen, gehören z.B. Muskeldystrophien, wie die Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) oder die Fazio-skapulo-humerale Muskeldystrophie (FSHD)^{4,5}. Diese Erkrankungen sind unheilbar, werden durch Biopsien diagnostiziert und durch Skelettmuskelschwäche charakterisiert. Bei DMD-Muskeln resultiert die mitochondriale Dysfunktion aus einer Ca^{2+} -Überladung, die zu einer substanziellen Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-Pore und einer Hemmung der ATP-Synthese führt, wodurch der Zelltod ausgelöst wird⁶. FSHD-Muskeln zeigen erhöhten oxidativen Stress, mitochondriale Dysfunktion und Entzündungen, die zu Muskelschäden und Fettinfiltration beitragen.

Eine vielversprechende therapeutische Strategie bei diesen neuromuskulären Erkrankungen ist die Mitochondrientransfertherapie, die systemische oder intramuskuläre Injektionen allogener Mitochondrien von gesunden Spendern, die in Dystrophin-defizienten Mäusen (mdx-Mäuse) untersucht wird⁷. Tatsächlich führte eine solche Behandlung in präklinischen Modellen zu einer reduzierten Muskelverletzung, normalisierter mitochondrialer Ultrastruktur, gesenkter Serum-Kreatinkinase sowie verbesserter Muskelkraft und motorischer Aktivität, wobei zusätzlich destruktive Prozesse in dystrophischen Muskelfasern und Kalziumüberladung gemildert wurden. Im Falle von FSHD erzielen auf Mitochondrien ausgerichtete Behandlungen mittels Antioxidantien (wie mitoTEMPO, Coenzym Q10), gute Ergebnisse, indem sie die hypotrophe Myotubusbildung und metabolische Defekte bei FSHD rückgängig machen konnten⁸.

Diese Wiederherstellung mitochondrialer Funktion erfordert nicht die vollständige Reparatur aller defekten Mitochondrien, da gezeigt wurde, dass eine ausreichend große Anzahl aktiver Mitochondrien in Zellen die normale Gewebefunktionalität vollständig wiederherstellen kann⁹.

Daher stellt der Transfer von Mitochondrien in Empfänger Muskeln einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur Behandlung vieler pathologischer Muskelzustände dar, insbesondere angesichts der vielversprechenden positiven Effekte von Mitochondrientransplantation, die Studien in präklinischen In-vivo-Tests zeigen. Die Anwendung isolierter Mitochondrien macht diese besonders empfindlich gegenüber enzymatischen und oxidativen Einflüssen, die ihre Funktion und Lebensfähigkeit beeinträchtigen können. Gängige Isolationsmethoden – etwa mechanische Disruption oder der Einsatz von Detergenzien – verursachen strukturelle Veränderungen der Mitochondrienmembranen und

erhöhen dadurch ihre Vulnerabilität gegenüber weiterem enzymatischem Abbau (z. B. durch Proteasen) sowie oxidativem Stress in der extrazellulären Umgebung¹⁰. Der wirksame Schutz isolierter Mitochondrien vor solchen Schädigungen stellt daher eine wesentliche methodische Herausforderung dar. Darüber hinaus resultiert die Kryokonservierung üblicherweise in einem deutlichen Verlust der mitochondrialen Aktivität nach dem Einfrieren und Wiederauftauen.

Hier präsentieren wir eine neuartige Plattform für Mitochondrientransfer durch fusionskompetente, entkernte Humane Myoblasten (Myokargozyten). Aufgrund der Erhaltung aller zellulären Strukturen außer den Nuklei, bieten Myokargozyten eine stabile intrazelluläre Umgebung, welche die funktionelle Integrität der Mitochondrien unterstützt. Unsere präliminären Daten zeigen, dass die Aktivität der Mitochondrienkomplexe in Myokargozyten mit den parentalen Zellen vergleichbar ist und bestätigt damit, dass der Prozess der Entkernung die Mitochondrienfunktionalität nicht beeinträchtigt. Nach 48 Stunden beobachteten wir noch aktive Mitochondrien, was durch funktionelle NAD(P)H-abhängige zelluläre Oxidoreduktase-Enzyme belegt wird, und hielten die ROS-Produktion auf dem gleichen Niveau wie in nicht entkernten Myoblasten. Myokargozyten sind bis zu 3 Tage nach der Entkernung noch viabel und eignen sich besser zur Kryokonservierung als isolierte Mitochondrien. Dies ermöglicht eine flexible Lagerung und anschließende Anwendung, ohne die Qualität oder Funktionalität der mitochondrialen Fracht zu beeinträchtigen. Aufgrund des Fehlens nukleärer DNA reduziert sich das mit traditionellen zellbasierten Therapien verbundene Risiko von unerwünschter Zellproliferation und macht Myokargozyten zu einer vielversprechenden Alternative zu bisherigen „Advanced Therapy Medicinal Products“ (ATMPs). Darüber hinaus behalten Myokargozyten ihre translationale Maschinerie und können mit zusätzlichen therapeutischen Faktoren, wie zB myomaker, einem fusogenen Oberflächenprotein, oder mit anti-inflammatorischen Cytokinen, ausgestattet sein.

Als Ausgangszelllinien verwendeten wir die mit Telomerase und Cdk4 immortalisierte Zelllinie LHCN-M211. Diese Linie sehen wir als Modell an, die in einer klinischen Entwicklung mit hypimmunen iPSCs, die in Myoblasten differenziert werden, ersetzt werden, um keine immunologischen Reaktionen hervorzurufen¹². Wir fusionierten Myokargozyten, die myomaker exprimieren, mit hypotrophen FSHD-Myotuben in vitro, was zu einer vergrößerten Fläche der gebildeten Myotuben führte. Darüber hinaus zeigte die molekulare Respirationsanalyse eine verbesserte Zellatmung nach Mitochondrientransfer durch unsere fusogene Myokargozyten. Dies ist besonders relevant, wenn man bedenkt, dass FSHD-Patienten eine deutlich verringerte Expression von OXPHOS-Genen im Muskel aufweisen. All diese in vitro Daten wurden im Rahmen meiner Dissertation am LBI für Traumatologie in Zusammenarbeit mit dem Labor von Peter Zammit am King's College London erarbeitet.

Zur Weiterentwicklung dieser vielversprechenden Therapie-Alternative schlagen wir hier nun die Durchführung von in-vivo-Experimenten vor. Ziel ist es, unsere bisherigen Ergebnisse im Tiermodell zu bestätigen und unsere Strategie zur Bekämpfung von Muskelerkrankungen und zur Muskelregeneration zu bewerten. Wir werden dafür zum einen ein FSHD-Mausmodell im

Rahmen unserer langjährigen Kooperation mit Peter Zammit und zum anderen ein hauseigenes Muskelregenerationsmodell verwenden, das chemisch induzierte Muskelschäden zur Muskelregeneration und chirurgische Ablation eines Muskelteils zur Muskelreparatur umfasst. Zusätzlich werden wir die Menge an gesunden Mitochondrien in den Myokarzysten steigern, indem wir Induktoren der mitochondrialen Biogenese (wie PGC-1 α) vor der Enukleation verwenden. Am Ende dieses Projekts werden wir den Machbarkeitsnachweis (Proof of Principle) erbracht haben, dass entkernte Zellen zur Übertragung gesunder Mitochondrien in neuromuskulären Defektmodellen als eine potenziell neuartige therapeutische Plattformtechnologie verwendet werden können. Diese Daten werden zusammen mit den bestehenden in vitro Daten in einem Fachjournal veröffentlicht werden.

Wien, Herbst 2025