

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

(Direktor: Professor Dr. med. Stephan Zierz)

Klinische, biochemische und genetische Charakterisierung des Myoadenylatdesaminasemangels

H a b i l i t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. habil.

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**von Dr. med. Frank Hanisch
geboren am 12.03.1971 in Altdöbern**

verteidigt am 24.09.2013

Gutachter:

- 1. Professor Dr. med. Hanns Lochmüller, Institute of Genetic Medicine,
Newcastle University, Newcastle upon Tyne**
- 2. Professor Dr. med. Peter Young, Klinik und Poliklinik für Medizin,
Universitätsklinikum Münster, Münster**

Referat und bibliographische Beschreibung

Zielsetzung: Das Enzym AMP-Deaminase baut unter kurzzeitiger, hochintensiver Belastung AMP zu IMP und Ammoniak ab. Die homozygote c.34C>T Stopmutation im *AMPD1* Gen, das für die muskelspezifische Isoform der AMP-Deaminase kodiert, ist für den größten Teil eines biochemisch und histologisch nachweisbaren AMP-Deaminasemangels im Skelettmuskel verantwortlich. Es ist nicht geklärt, ob eine homozygote c.34C>T Mutation zu klinischen Beschwerden (z. B. belastungsabhängigen Myalgien) führt. Ebenso sind Kompensationsmechanismen bei AMP-Deaminasemangel unbekannt.

Zielstellung: Die Häufigkeit der c.34C>T Mutation wurde in verschiedenen Populationen bestimmt, um anhand von Genotyp-Phänotyp-Vergleichen zu untersuchen, ob ein AMP-Deaminasemangel mit belastungsabhängigen Beschwerden korreliert oder bei Vorliegen einer anderen definierten Myopathie die AMP-Deaminase sekundär vermindert ist. Außerdem wurden erstmalig Fraktionen der 5'-Nukleotidasen im Skelettmuskel analysiert, um zu untersuchen, inwieweit der Abbau von AMP zu Adenosin als alternativer Abbauweg bei AMP-Deaminasemangel eine Rolle spielt. Mittels eines funktionellen Tests wurde der Rolle von Ammoniak als positiver Effektor der Glykogenolyse untersucht.

Methoden: 294 Patienten und 107 gesunde Blutspender wurden auf das Vorliegen der c.34C>T Mutation gescreent. Klinische Daten der muskelbiopsierten Patienten wurden mit den biochemischen und histologischen Daten korreliert. Bei einer Subgruppe der Patienten wurden Fraktionen der 5'-Nukleotidase im Skelettmuskel bestimmt. Ein Teil der Patienten sowie gesunde Kontrollen unterzogen sich einer standardisierten Handkraftdynamometer-Untersuchung.

Ergebnisse: Die vorliegende Studie zeigt keine Unterschiede in den Allelfrequenzen für die c.34C>T Mutation bei gesunden Kontrollen, Patienten mit Myalgien und definierten Myopathien. Ein AMP-Deaminasemangel scheint nicht mit einem höheren Auftreten von belastungsabhängigen Beschwerden und Myalgien oder einem anderen abgrenzbaren Phänotyp assoziiert zu sein. Es gibt keinen biochemischen Anhalt dafür, dass eine sekundäre AMP-Deaminasedefizienz im Gefolge einer anderen neuromuskulären Erkrankung auftritt. Compound Heterozygotie bei heterozygoter c.34C>T Mutation ist selten und resultierte in unserer Kohorte nicht in biochemischen Aktivitäten, wie sie typisch für den homozygoten Karrierstatus sind. Es ließen sich keine Unterschiede in den Aktivitäten der Gesamt 5'-Nukleotidase, der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase und der Ekto-Nukleotidase im Skelettmuskel bei Patienten mit und ohne c.34C>T nachweisen. Faktoren wie die Fasertypenzusammensetzung, das Alter und Geschlecht, scheinen an Hand der Daten unserer Kohorte keinen Einfluss auf die Aktivität der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase oder AMP-Deaminase zu haben. Ein AMP-Deaminasemangel scheint *in-vivo* bei kurzzeitiger und hochintensiver Belastung weder den Citratzyklus (anaplerotische Funktion), noch die Glykolyse durch verminderte allosterische Aktivierung der Phosphofruktokinase infolge verringerter Ammoniak-Erhöhung zu beeinflussen.

Schlussfolgerungen: Anhand der Ergebnisse unserer Studie lässt sich keine klinische Relevanz eines biochemisch und genetisch nachweisbaren AMP-Deaminasemangels ableiten. Die in vorherigen Studien berichtete vermehrte Bildung von Adenosin im Skelettmuskel bei kurzzeitiger, hochintensiver Belastung scheint nicht durch eine erhöhte Expression oder eine veränderte Kinetik der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase bei AMP-Deaminasemangel bedingt zu sein. Eher scheint der Umsatz des akkumulierten AMP durch eine höhere Aktivität der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase bei einer erhöhten Substratverfügbarkeit an AMP erhöht zu sein. Die Kompensation eines AMP-Deaminasemangels unter hochintensiver, kurzzeitiger anaerober Aktivitäten der Skelettmuskulatur bleibt unklar.

Bibliographie

Hanisch, Frank: Klinische, biochemische und genetische Charakterisierung des Myoadenylatdeaminasemangels. Halle (Saale), Universität, Medizinische Fakultät, Habilitation, 99 Seiten, Erscheinungsjahr 2012

X Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPD	AMP-Deaminase
<i>AMPD1</i>	Gen für Skelettmuskelisoform der AMPD (syn. Myoadenylatdeaminase)
<i>AMPD2</i>	Gen für Leberisoform der AMPD
<i>AMPD3</i>	Gen für Erythrozytenisoform der AMPD
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the Curve (Fläche unter der Kurve)
bp	Base Pair (Basenpaar)
CC	Homozygotie für Wildtyp in Position 34 des Exon 2 im <i>AMPD1</i>
CT	Heterozygotie für <i>AMPD1</i> c.34C>T Mutation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
g	Gravitationskonstante
Hz	Hertz
IFET	ischemic forearm exercise test
IMP	Inosinmonophosphat
kDa	KiloDalton
K_m	Michealis-Menten-Konstante
MAF	mutant allele frequency (Häufigkeit eines mutierten Allels)
MCF	maximal contraction force (maximale Kontraktionskraft)
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NCP	Nichtkollagenes Protein
NH₃	Ammoniak

pH	pH-Wert
TT	Homozygotie für <i>AMPD1</i> c.34C>T Mutation

XX INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seitenzahl</u>
Referat und bibliographische Beschreibung.....	2
X Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole.....	3
XX Inhaltsverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	8
1.1 Die AMP-Deaminase (syn. Myoadenylatdeaminase) – ein Enzym des Purinnukleotidzyklus.....	8
1.1.1 Die AMP-Deaminase.....	8
1.1.2 Unterschiedliche Isotypen der AMP-Deaminase.....	10
1.1.3 Skelettmuskel-Fasertypen und AMP-Deaminase-Aktivität.....	11
1.2 Der AMP-Deaminasemangel.....	12
1.3. Die Funktionen des Purinnukleotidzyklus und mögliche Pathomechanismen des AMP-Deaminasemangels	16
1.4. Hypothesen zur Erklärung der klinischen und biochemischen Folgen des AMP-Deaminasemangels im Skelettmuskel.....	17
1.4.1 Der AMP-Deaminasemangel als harmloser Polymorphismus	17
1.4.2 Die Hypothese vom primären und sekundären AMP- Deaminasemangel.....	18
1.4.3 Alternatives Spleißen von <i>AMPD1</i> Exon 2.....	19
1.4.4 Die Aufregulation der Isoformen L und E im Skelettmuskel....	19
1.4.5 AMP-Abbau über die zytosolische AMP-5'-Nukleotidase als Umgehungskreislauf.....	20
2. Zielstellung.....	23
3. Patienten und Methoden.....	25
3.1 Patienten.....	25
3.2 Der standardisierte Handkrafttest.....	26
3.3 Muskelbiopsie und Materialasservierung.....	29
3.4 Histochemische Untersuchungen.....	29
3.4.1 Die myofibrilläre ATPase (pH 9.4) Färbung.....	29

3.4.2	Die p-Nitroblau Tetrazoliumfärbung zur histochemischen AMP-Deaminase Darstellung.....	30
3.5	Biochemische Untersuchungen.....	32
3.5.1	Die biochemische Bestimmung der AMP-Deaminaseaktivität.....	32
3.5.2	Die biochemische Bestimmung der zytosolischen 5'-Nukleotidaseaktivität	32
3.6	Western-Blot-Untersuchungen.....	33
3.7	Molekulargenetische Untersuchungen.....	34
3.7.1	Die genetische Analyse der c.34C>T Mutation.....	34
3.7.2	Die genetische Analyse der c.468G>T Mutation.....	35
3.7.3	Die genetische Analyse der c.860A>T Mutation.....	36
3.7.4	Die genetische Analyse des gesamten <i>AMPD1</i>	37
3.8	Statistische Analyse.....	38
4.	Ergebnisse.....	39
4.1	Ergebnisse der Kohortenuntersuchungen.....	39
4.2	Ergebnisse der Untersuchungen der Nukleotidasen.....	43
4.3	Ergebnisse aus der Untersuchung des standardisierten Handkrafttestes.....	48
5	Diskussion.....	51
5.1	Die Häufigkeit eines mutierten <i>AMPD1</i> Allels in verschiedenen Populationen.....	51
5.2	Der klinische Phänotyp bei homozygoter c.34C>T Mutation... ..	52
5.3	Die Restaktivität bei Homozygotie für die c.34C>T Mutation... ..	52
5.4	Andere <i>AMPD1</i> Genotypen.....	53
5.5	Die Auswirkungen hochintensiver Belastung in Abhängigkeit vom <i>AMPD1</i> Genotyp bei Gesunden.....	57
5.5.1	Parameter für hochintensive, kurzzeitige Belastung.....	57
5.5.2	NH ₃ als Effektor der Glykolyse in-vivo.....	58
5.5.3	Der <i>AMPD1</i> Genotyp als Prädiktor zur Eignung für den Hochleistungssport.....	58
5.5.4	Der <i>AMPD1</i> Genotyp im Rahmen eines polygenetischen, mit Belastungsintoleranz assoziierten Profils.....	59

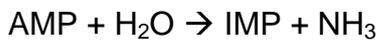
	<u>Seitenzahl</u>
5.6 Der Einfluss der zytosolischen 5'-Nukleotidasen auf den AMP-Abbau.....	60
5.6.1 Der intramuskuläre Adenosinspiegel nach kurzzeitiger, hochintensiver Belastung.....	60
5.6.2 Expression oder Kinetik der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase bei AMP-Deaminasemangel.....	62
5.6.3 Der Einfluss der verschiedenen zytosolischen 5'-Nukleotidasen auf den AMP-Abbau im Skelettmuskel.....	63
5.6.4 Die Adenosinproduktion bei AMP-Deaminasemangel und die Auswirkungen auf den Herzmuskel.....	64
6. Schlussfolgerung.....	67
7. Literaturverzeichnis.....	69
8. Verzeichnis der Fremdwort- und Fachworterläuterungen.....	91
9. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	92
9.1 Verzeichnis der Abbildungen.....	92
9.2 Verzeichnis der Tabellen.....	94
10. Thesen.....	95
11. Tabellarischer Lebenslauf.....	97
12. Danksagung.....	98

1. EINLEITUNG

1.1 Die AMP-Deaminase (syn. Myoadenylatdesaminase) – ein Enzym des Purinnukleotidzyklus

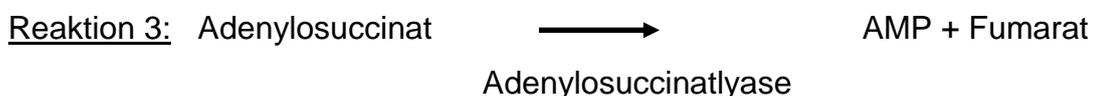
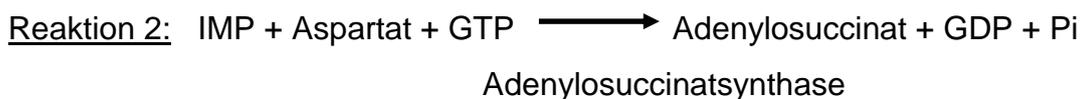
1.1.1 Die AMP-Deaminase

Die Beziehung zwischen Muskelarbeit und der Bildung von Ammoniak (NH₃) wurde bereits in den 20iger Jahren in den Laboratorien von Parnas und Embden untersucht (Parnas et al. 1927, Embden et al. 1928). Beide Gruppen erkannten die Adenylatdesaminasereaktion (AMP-Desaminase, EC 3.5.4.6). als Hauptquelle der NH₃-Bildung im Muskel (Schmidt 1928):



Die AMP-Deaminase katalysiert die Hydrolyse von AMP zu Inosinmonophosphate (IMP) und Ammoniak (NH₃). Wird also AMP aus dem Gleichgewicht entfernt, kann diese die Myokinasereaktion unter Belastungsbedingungen in Richtung ATP Bildung, d. h. einer Energieträgerproduktion verschieben.

Diese Reaktion ist unter physiologischen Bedingungen nicht reversibel. Es wurde geschlussfolgert, dass andere Reaktionen existieren müssen, die IMP zu AMP zurückverwandeln. Diese Reaktionen wurden erst 1955 identifiziert und stellen in ihrer Gesamtheit den Purinnukleotidzyklus dar, der Anfang der 70er Jahre diese Bezeichnung erhielt (Lowenstein et al. 1972).



Die durch die AMP-Deaminase katalysierte Reaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für den Eintritt in den Purinnukleotidzyklus. IMP wiederum wird durch die Adenylosuccinatsynthetase (EC 6.3.4.4) in Adenylosuccinat umgewandelt. Im dritten Schritt des Zyklus wird Adenylosuccinat unter Freisetzung von von Fumarat wieder in AMP umgewandelt (Van den Berghe et al. 1992).

1971 wurde aus Skelettmuskelhomogenaten der Ratte gezeigt, dass diese aus Aspartat NH_3 unter Verbrauch von ATP bilden, das heißt unter Bedingungen, die den Vorgängen bei Muskelarbeit entsprechen (Lowenstein 1971). Anschließend wurde in *in vivo* Experimenten an den Hinterläufen der Ratte gezeigt, dass Adenylsuccinat im ruhenden Muskel nicht nachweisbar ist und IMP nur in geringen Konzentrationen und dass beide Substanzen unter hochintensiver Muskelarbeit steil ansteigen, Es wurde gezeigt, dass NH_3 stoichiometrisch mit IMP ansteigt, das heißt, beide Substanzen langsam aus dem Muskel diffundieren (Lowenstein et al. 1978).

Während kurzzeitiger, hochintensiver Belastung der Skelettmuskulatur übersteigt die Rate des ATP Verbrauches (die ATP Hydrolyse) das Vermögen der Muskelzelle, mittels Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung ATP zu generieren. Dies trifft besonders auf Muskeln mit geringer aerobischer Kapazität (Typ-II Muskeln) zu. Kreatinphosphat agiert als kurzzeitiger Puffer, mit dem hohe ATP Konzentrationen über die Kreatinkinasereaktion aufrechterhalten werden:



Normalerweise handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion in Ruhe und unter Belastung, die Aktivität der Kreatinkinase im Skelettmuskel ist sehr hoch. Wenn jedoch die Kapazität des Kreatinphosphatpuffers überschritten wird, wie dies bei hochintensiver anerobischer Belastung der Fall ist, d. h. wenn Kreatinphosphat aufgebraucht ist, steigt ADP an, das während der Muskelkontraktionen anfällt. Dies führt zu einer vermehrten Bildung von AMP über die Myokinase-Reaktion



Auch diese Reaktion ist unter den meisten physiologischen Bedingungen im Gleichgewicht, die hohe Konzentration der Myokinase im Skelettmuskel spricht dafür. Folglich steigen ADP und AMP parallel an. ADP wiederum ist der wirkungsvollste Aktivator der AMP-Deaminase.

Außerdem steigt Laktat unter den Bedingungen anerober Belastung an. Die dadurch bedingte intramuskuläre Verringerung des pH Wertes dient ebenfalls der Aktivierung der Adenylatdeaminase. Das pH Optimum dieses Enzyms liegt bei 6.2 (Wheeler und Lowenstein et al. 1979)

Die Aktivierung der Adenylatdeaminase führt zum Entfernen von AMP, mit dem Ergebnis, dass die AMP-Deaminasereaktion nach rechts verschoben wird und ein hoher ATP/ADP-Quotient erreicht wird. IMP hingegen akkumuliert kurzzeitig unter den Bedingungen hochintensiver anerober Belastung, da die AMP-Deaminase eine weitaus höhere Aktivität als die anderen beiden Enzyme des Purinnukleotidzyklus, die Adenylatsuccinatsynthase und die Adenylosuccinase, haben.

1.1.2 Unterschiedliche Isotypen der AMP-Deaminase

Die oben beschriebenen Vorgänge gelten ubiquitär, dennoch sind sie von großer Bedeutung für den arbeitenden Skelettmuskel. Es gibt jedoch drei gewebsspezifische AMP-Deaminase Isoenzyme, die auf jeweils unterschiedlichen Genen kodiert sind und die gewebsspezifisch exprimiert werden:

AMPD1 auf Genlocus 11p21-p13 (accession number NM_000036), das aus 16 Exonen besteht, kodiert für die Skelettmuskel-Isoform der AMP-Deaminase (ältere Synonyma: Myoadenylatdeaminase, Isoform M, mAMPD) (Morisaki et al. 1990, Sabina et al. 1990). Es gibt eine große Ähnlichkeit in den Nukleotidsequenzen zum *AMPD2*, zudem liegen beide Gene relativ benachbart auf dem gleichen Gen, so dass entwicklungsgeschichtlich davon auszugehen ist, dass beide Gene (*AMPD1* und *AMPD2*) aus einem gemeinsamen Ursprungs- oder Vorläufergen durch Duplikation entstanden sind.

Diese Isoform ist weitgehend auf den Skelettmuskel beschränkt, wo eine starke Expression dieses Enzyms nachzuweisen ist (Bausch-Jurken et al. 1982, Ogasawara et al. 1982, Kaletha et al. 1988). Die Aktivität dieser Isoform ist zudem ca. 100-fach höher im Skelettmuskel als in andere Geweben (Marquetant et al. 1987, Ogasawara et al. 1978, Sabina et al. 1989).

Die gereinigte Isoform weist eine hyperbolische Substratsättigungskurve auf mit einer K_m von 0.6-1 mM bei einem pH Optimum von 6.3-6.7 (Ogasawara et al. 1982).

AMPD2 auf Chromosom 1p13.3 (accession number NM_004037) enthält 19 Exone und kodiert für die Isoform L oder Leberisoform, die in nichtmuskulären Geweben exprimiert wird, aber auch in glatter Gefäßmuskulatur und in undifferenzierten Myoblasten (Ogasawara et al. 1982, Mahnke-Zizelman et al. 1986, Bausch-Jurken et al. 1992, Eddy et al. 1993). Die K_m beträgt 4-6.6 mM bei einem pH-Optimum von 6.3-6.6.

AMPD3 auf dem Genlokus 11per-p13 (accession number NM_001025390) kodiert für die zwei Erythrozyten-Isoformen E1 und E2.

Diese Isoform wird ubiquitär exprimiert. Es ist die vorherrschende Isoform im Herzmuskel und sie wird geringfügig auch im Skelettmuskel exprimiert (Yun et al. 1978, Ogasawara et al. 1982, Ogasawara et al. 1987, Nowak und Kaletha 1991, Mahnke-Zizelman und Sabina 1992, Yamada et al. 1992, Eddy 1993, Yamada et al. 1994).

Die K_m beträgt 0.6-0.8 mM bei einem pH-Optimum von 7.0-7.1.

1.1.3 Skelettmuskel-Fasertypen und AMP-Deaminase-Aktivität

Es gibt Unterschiede in der Aktivität der AMP-Deaminase in den zwei Hauptfasertypen im Skelettmuskel:

Beim Kaninchen, bei Tauben und Ratten konnte gezeigt werden, dass die sogenannten weißen Muskeln, die einen hohen Anteil glykolytischer Typ-II Fasern aufweisen, eine höhere AMP-Deaminaseaktivität aufweisen als sogenannte rote Muskeln, die einen hohen Anteil oxidativer Typ-I Fasern aufweisen (Gerez und Kirsten 1965, Raggi et al. 1969, Ogasawara et al. 1983, Norman et al. 1998).

In der Ratte wies der M. quadriceps, der zu einem hohen Anteil aus Typ-II Fasern besteht, eine zweieinhalbfach höhere AMP-Deaminaseaktivität im Vergleich zum M. soleus, der hauptsächlich aus Typ-I Fasern besteht, auf (Winder et al. 1974).

In humanen Muskelproben wurde eine 2.8-fach höhere AMP-Deaminaseaktivität in Typ-II als Typ-I Fasern gemessen. Für die Adenylatkinase lag das Verhältnis sogar bei 4.5 zu 1 (Fishbein et al. 1984, 1986).

In Übereinstimmung mit den oben aufgeführten Befunden wurde gezeigt, dass die *AMPD1* mRNA der Ratte am höchsten im M. gastrocnemius (überwiegend Typ-II-Fasern) und am geringsten im M. soleus (fast ausschließlich Typ-I Fasern) (Sabina et al. 1987).

1.2 Der AMP-Deaminasemangel

1978 wurden 5 Patienten mit einer Muskelschwäche und belastungsinduzierten Crampi beschrieben, bei denen histologisch die AMP-Deaminase nicht nachweisbar war (Fishbein et al. 1978). Wenig später stand auch die biochemische Bestimmung der AMP-Deaminase zur Verfügung (Fishbein et al. 1978, 1980, 1980a, 1983). Parallel dazu entwickelte Fishbein den Laktat-Ischämie-Test (ischemic forearm exercise test, IFET) als klinischen Screeningtest für den AMP-Deaminasemangel (Fishbein et al. 1978, 1980, 1980a). Dieser Test wurde zunächst 1951 von McArdle zur Diagnostik von Glykogenosen eingeführt - bei diesen Erkrankungen kommt es zu einem verringerten oder fehlenden Laktatanstieg. Erst Fishbein führte den gleichsinnigen Anstieg von Laktat und Ammoniak unter Belastungsbedingungen als diagnostisches Kriterium ein und charakterisierte den fehlenden oder hochgradig verringerten NH_3 -Anstieg bei kurzzeitiger, hochintensiver Belastung als diagnostisch wegweisend für einen AMP-Deaminasemangel.

In Bezug auf die Funktion und die Kenntnisse über die Aktivierung der AMP-Deaminase wurden zunächst belastungsabhängige Beschwerden und Symptome – belastungsabhängige Myalgien, Crampi und Fatigue - einem AMP-Deaminasemangel zugeschrieben (Fishbein et al. 1978, Kar et al. 1981, Hayes et al. 1982, Kelemen et al. 1982, Rossi et al. 1984, Sabina et al. 1984, Ashwal

et al. 1985, Lally et al. 1985, Goebel et al. 1986). Kurzgefasst wurde dafür folgendes Szenario als Erklärung herangezogen: Die AMP- Deaminasereaktion löst die Adenylatkinasereaktion ab in Richtung der ATP Bildung unter Belastung ab. Dies verhindert einerseits eine größere ADP Akkumulation und liefert zusätzliche Energie. Eine hohe ATP / ADP Ratio ist auch vorteilhaft für die Aufrechterhaltung von Muskelarbeit. Die ADP Akkumulation bei intensiver Belastung kann zu einer reduzierten maximalen Verkürzungsgeschwindigkeit (shortening velocity) und zu einer verlangsamten Relaxationszeit führen, wie bei Nagetieren (Ratten, Kaninchen) gezeigt wurde (Cooke et al. 1985, Westerblad et al. 1994, 1998). Deshalb wurde vermutet, dass der AMP-Deaminasemangel zu einer frühzeitigen Inhibition der Muskelkontraktion und zu einer schnelleren Entwicklung von Fatigue führen könnte. Die häufige Assoziation von belastungsinduzierten Myalgien, Fatigue und Crampi in frühen Berichten über AMP Deaminasemangel sprachen für diese Hypothese.

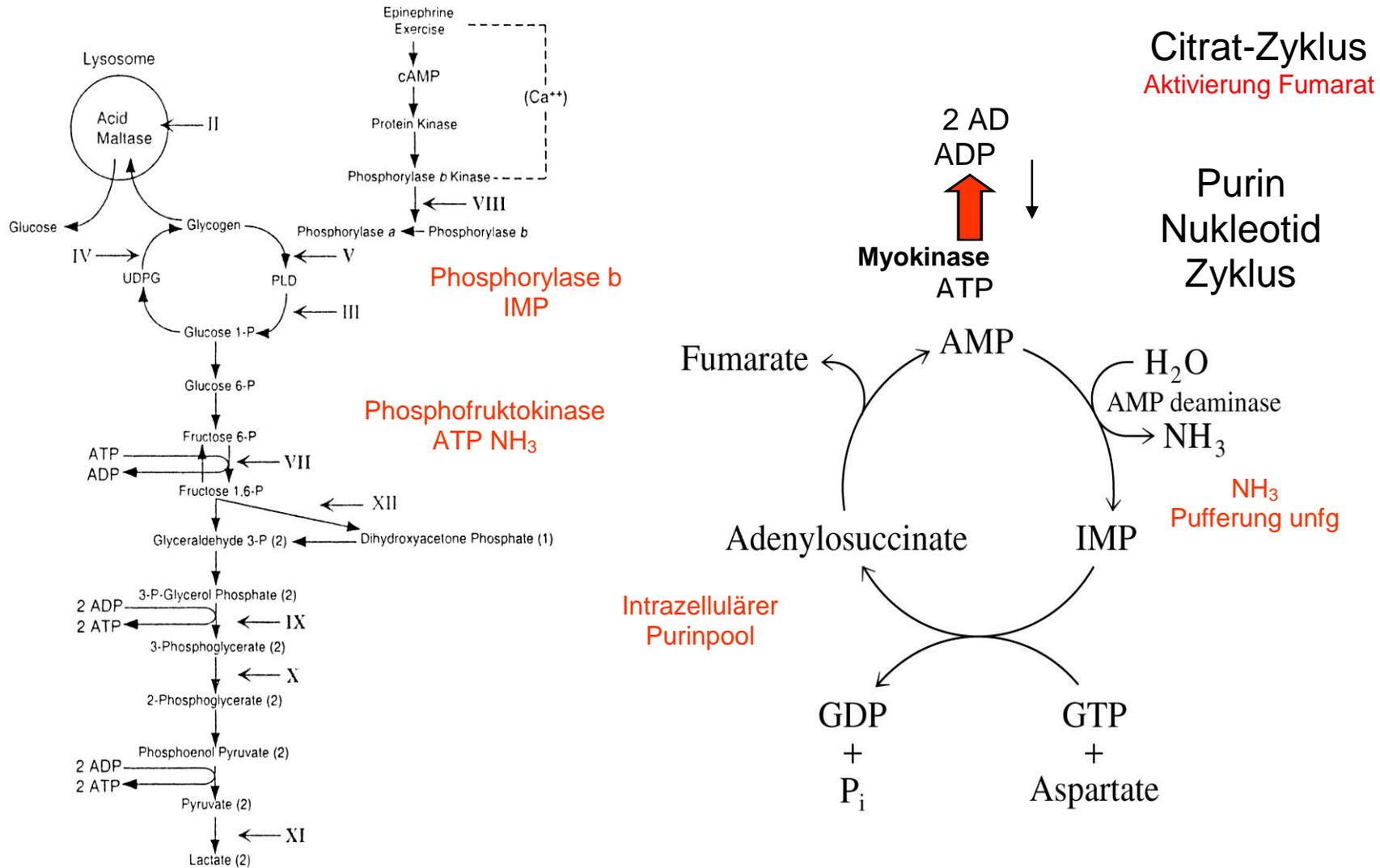
Im Verlauf wurden zu einer Zeit, in der noch nicht oder kaum molekulargenetische und immunhistochemische Untersuchungsmethoden im Bereich der Myologie zur Verfügung standen, eine Vielzahl höchst unterschiedlicher Erkrankungen, darunter nicht ausschließlich Muskelerkrankungen, in Fallserien und Einzelfallberichten in Assoziation mit einem biochemischen oder histologischen AMP-Deaminasemangel beschrieben.

Dies betraf: u. a. Mausmodelle (Pennington et al. 1962), diverse Muskelerkrankungen wie Duchenne Muskeldystrophie (Kar und Pearson 1973, Nagao et al. 1986), Gliedergürteldystrophie (Merclis et al. 1981), Dermatomyositis (Kar et al. 1981), kongenitale Myopathie, Fazioskapulohumerale Muskeldystrophie, Polymyositis (Merclis et al. 1987), Myotone Dystrophie (Merclis et al. 1987, Scola et al. 2003), Carnithin-Palmitoyl-Transferase-II-Mangel (Reuschenbach und Zierz. 1988), Mitochondriopathie (Tsao et al. 1990, Fricker et al. 2002), Rhabdomyolyse (Zimmer et al. 1991, Baumeister et al. 1993), McArdle-Glykogenose Typ V (Heller et al. 1987, Tsujino et al. 1995, Rubio et al. 1997, 2000), Phosphofruktokinase-Mangel (Bruno et al. 1998), idiopathische Hyper Ckämia (Brewster und de Visser 1988), neurologische, nichtmyopathische Erkrankungen wie olivopontozerebelläre Degeneration (Uziel et al. 1986),

Polyneuropathie, spinale Muskelatrophie (Nagao et al. 1986, Skyllouriotis et al. 1997), hypertrophe Kardiomyopathie (Skyllouriotis et al. 1997), andere Erkrankungen zumeist aus dem rheumatologischen Formenkreis wie progressive systemische Sklerose (Kar et al. 1981, Gertler und Jacobs 1984), Gicht (Di Mauro et al. 1980), Polyarthralgien (Lally et al. 1985), Myofasiales Schmerzsyndrom (Marin et al. 1997).

Schon bald nach der Entdeckung des AMP-Deaminase-Mangels hatte sich jedoch gezeigt, dass es sich bei diesem um den häufigsten Enzymdefekt im Skelettmuskel handelt. In histochemischen Untersuchungen fand sich in 1.1 - 2.9% der Skelettmuskelproben ein AMP-Deaminasemangel (Fishbein et al. 1978, Keleman et al. 1982, Mercelis et al. 1987, Kar et al. 1981).

Abbildung 1. Der Purinnukleotidzyklus und dessen Interaktion mit anderen Stoffwechselwegen (rot)



1.3. Die Funktionen des Purinnukleotidzyklus und mögliche Pathomechanismen des AMP-Deaminasemangels

Folgende Funktionen und Interaktionen des Purinnukleotidzyklus werden postuliert (Lowenstein 1990) (Abbildung 1):

1. Regulation der AMP-, ADP- und ATP-Konzentrationen und Aufrechterhaltung eines hohen ATP/ADP-Quotienten.

Während tetanischer Stimulation von Rattenmuskeln *in situ* nimmt der Gesamtadeninnukleotidegehalt im *M. gastrocnemius* (überwiegend Typ II Fasern) um 50%, im *M. solus* (überwiegend Typ I Fasern) nur um 10% ab (Meyer und Terjung 1979). Der Abfall der Adeninnukleotide unter Belastung entsprach stoichiometrisch dem Anstieg von IMP und NH_3 . Während der Erholungsphase korrespondierte die abnehmende IMP-Konzentration mit der Adeninnukleotid-Resynthese. Ähnliche Befunde wurden auch beim Menschen erhoben (Katz et al. 1986), so dass der AMP-Deaminierung eine wichtige Rolle in der Regulation und Erhaltung der Adenylatenergieladung und der Adenylat-Poolgröße zugewiesen wurde. In einem Mausmodell, dem ein Inhibitor der Adenylatsuccinatlyase infundiert wurde, kam es zu einer Akkumulation von Metaboliten des Purinzyklus (Anstieg von IMP und Adenylatsuccinatlyase) und zu einer muskulären Dysfunktion bei Stimulation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Swain et al. 1984). Der ATP Pool wird in der Regel nach Belastung in Ruhe innerhalb von 15-30 min aufgefüllt und wiederhergestellt.

2. Lieferant von Fumarat zur Bildung von Intermediaten des Citratzyklus (anaplerotische Funktion)

Fumarat, das im 3. Schritt des Purinnukleotidzyklus durch die Adenylosuccinatlyase gebildet wird, kann in Malat umgewandelt werden, somit in die Mitochondrien eingeschleust werden und zur Aktivierung der aeroben Energieproduktion beitragen. Damit könnten Metabolite des Purinnukleotidzyklus über die Produktion von Intermediaten des Citratzyklus während aerober Belastung den oxidativen Metabolismus fördern.

3. NH_3 dient als Gegenregulator des laktatbedingten intramuskulären pH-Abfalls.

Während hochintensiver anaerober Muskelarbeit fallen Laktat durch die aktivierte Glykolyse und H^+ durch die ATP-Hydrolyse an. Dies führt zu einem azidotischen Milieu in kontrahierenden Myozyten, das zur Aktivierung der AMP-Deaminase führt, deren pH Optimum bei 6.5 liegt. In funktionellen Untersuchungen an Kontrollen, die sowohl dynamische Kontraktionen und Übungen mit isometrischer Kontraktion ausführten, wurde festgestellt, dass durch das dabei anfallende NH_3 nur 3% der Wasserstoffionen und des Laktats gepuffert werden können (Sahlin et al. 1978, Katz et al. 1986). Es wurde geschlussfolgert, dass dieser Pufferungsmechanismus nur von untergeordneter Bedeutung in humanen Muskelzellen ist.

4. AMP dient als Aktivator der Phosphofruktokinase und damit als Regulator der Glykolyse

Es wurde vermutet, dass der Purinnukleotidzyklus über die Bildung von Effektormolekülen mit dem Glykogenolysepfad interagiert. Der lokale NH_3 Anstieg und der ATP-Abfall stimulieren die Phosphofruktokinase. Außerdem könnte die Erhöhung der IMP-Konzentration die Glykogen-Phosphorylase b aktivieren. Sowohl IMP als auch NH_3 sind positive *in vitro* Effektoren der Myophosphorylase b und der Phosphofruktokinase (Abraham et al. 1971). Allerdings wird sofort nach Beginn anaerober Tätigkeit Laktat gebildet, während NH_3 erst nach 30 s beginnt zu akkumulieren.

1.4. Hypothesen zur Erklärung der klinischen und biochemischen Folgen des AMP-Deaminasemangels im Skelettmuskel

1.4.2 Der AMP-Deaminasemangel als harmloser Polymorphismus

Nach der Entdeckung des *AMPD1* Genes, das für die Skelettmuskelisoform kodiert, zeigte sich rasch, dass eine Stopmutation c.34C>T für fast alle biochemisch und histochemisch nachweisbaren Fälle verantwortlich ist. Es zeigte sich aber auch, dass diese Mutation homozygot und heterozygot in der

Normalbevölkerung zu finden ist. (Sabina et al. 1990, Morisaki et al. 1992, Gross et al. 1994, 1994, 1994b, Verzijl et al. 1998).

Der Mangel eines definierbaren klinischen Musters an konsistenten und nachweisbaren neuromuskulären Symptomen, die hohe Prävalenz des Defektes in der Gesamtbevölkerung und der hohe Anteil asymptomatischer Individuen verführte schon bald einige Wissenschaftler dazu, die AMP-Deaminasedefizienz als „zufälligen Befund“, „eine harmlose genetische Variante“ oder „eher als eine normale Variante denn eine Erkrankung“ einzuordnen (Shumate et al. 1979, Joosten et al. 1984, Serratrice et al. 1986, Verzijl et al. 1998).

Bis in die Gegenwart ist die klinische Relevanz des genetisch und biochemisch nachweisbaren AMP-Deaminasemangels umstritten.

Mechanismen, die die AMP-Deaminasedefizienz kompensieren, wurden bisher nicht gefunden.

1.4.2 Die Hypothese vom primären und sekundären AMP-Deaminasemangel

1986, vor der Beschreibung des *AMPD1* Gens, schlug Fishbein zwei Typen der AMP-Deaminase-Defizienz im Skelettmuskel vor (Fishbein 1986, 1999):

1. eine primäre oder genetische Form (autosomal-rezessiver Erbgang) mit hochgradig verringerten AMP-Deaminase-Aktivitäten und
2. eine Form mit intermediären AMP-Deaminase-Aktivitäten, die einerseits dem Heterozygotenstatus entsprechen könnte oder einer sekundären, erworbenen Form, in der die AMP-Deaminase im Rahmen einer anderen neuromuskulären Erkrankung (sogenannter „double trouble“) verringert ist.

Die Hypothese beruhte darauf, dass er einen hochgradigen AMP-Deaminasemangel (<1% der normalen AMP-Deaminaseaktivität) bei Patienten mit normaler Muskelbiopsie fand, die er der primären Form zuordnete und eine mäßiggradig verminderte Aktivität der AMP-Deaminase (2.1-10.3% des Normalwertes) bei Patienten mit myositischen und myopathisch/dystrophen Veränderungen in der Muskelbiopsie, die er einer erworbenen Form zuordnete. Später wurde auch der verringerte Gehalt der *AMPD1* mRNA in Patienten mit

histologischen Zeichen einer Myositis im Vergleich zu Kontrollen mit unspezifischen Veränderungen in der Muskelbiopsie als Argument für diese Hypothese herangezogen (Sabina et al. 1992), allerdings konnte dieser Befund nicht bestätigt werden (Morisaki et al. 1992).

1.4.3 Alternatives Spleißen von *AMPD1* Exon 2

Alternatives Spleißen kann das Exon 2 in *AMPD1* mRNA Transkripten aus dem humanen Skelettmuskel in 0.6-2.0% der Fälle reduzieren. Allerdings zeigten Expressionsstudien, dass *AMPD1* mRNA mit entferntem Exon 2 für ein funktionsfähiges AMP-Deaminasepeptid kodiert (Mineo et al. 1990, Morisaki et al. 1993a, 2000a). Potentielle Spleiß-Varianten sollten zur Variabilität der klinischen Symptome beizutragen.

Die Spleißvorgänge im *AMPD1* sind jedoch entwicklungsgeschichtlich gesteuert: In Myoblasten und im fetalen Muskel wird das Exon 2 überwiegend gespleißt, während es im erwachsenen, reifen Muskel weitgehend erhalten bleibt (Sabina et al. 1989, Morisaki et al. 1993a).

Andere Einflüsse scheinen ebenfalls das Spleißverhalten zu beeinflussen: Bei Ratten stieg die Spleißrate von *AMPD1* Exon 2 von 20% in normalen M. gastrocnemius auf 36% im M. gastrocnemius nach Denervation an (Fortuin et al. 1996).

1.4.4 Die Aufregulation der Isoformen L und E im Skelettmuskel

Höhere AMP-Deaminaseaktivitäten lassen sich in Muskeln mit einem höheren Gehalt an glykolytischen Typ-II Muskelfasern finden (Siehe Kapitel 1.1.3). Die vermehrte Expression anderer AMP-Deaminase-Isoformen (Isoform L kodiert auf *AMPD2*, Isoform E kodiert auf *AMPD3*) könnte hypothetisch einen Mangel der sonst dominierenden *AMPD1* Skelettmuskelisoform kompensieren. Morisaki et al. (1992) postulierte, dass die Restaktivität im Skelettmuskelhomogenat von Patienten mit homozygotem AMP-Deaminasemangel die AMP-Deaminaseaktivität der anderen Isoformen in Nichtmyozyten widerspiegelt, da diese Aktivität nicht reaktiv auf Antiseren war, die spezifisch für das *AMPD1* Genprodukt waren (Fishbein et al. 1985, Sabina et al. 1992). Es wurde berichtet, dass die Isoform E (Siehe auch Kapitel 1.12) zu 18-76% zur

Residualaktivität der AMP-Deaminase bei symptomatischen Patienten mit homozygoter c.34C>T Mutation beiträgt (Fishbein et al. 1993, Van Kuppevelt et al. 1994). Ein kompensatorischer Anstieg der *AMPD2* und *AMPD3* Genexpression in AMP-Deaminase defizienten Patienten wurde jedoch nicht gefunden (Mahnke-Zizelmann und Sabina 1992).

Es wurde jedoch eine umgekehrte Korrelation zwischen der AMP-Deaminaseaktivität und dem Gehalt an Typ-I Muskelfasern bei Probanden mit *AMPD1* Wildtyp und Heterozygoten für die Mutation c.34C>T und eine positive Korrelation zwischen der AMP-Resaktivität und dem Gehalt an Typ-I Fasern homozygoter Probanden für die c.34C>T Mutation gefunden (Norman et al. 1998). Dies könnte diese Hypothese stützen.

1.4.5 AMP-Abbau über die zytosolische AMP-5'-Nukleotidase als Umgehungskreislauf

Zunächst wurden in einer Fahrradbelastungsuntersuchung mit hoher Intensität nach Belastung ähnliche Plasmakonzentrationserhöhungen von Laktat, Pyruvat, Inosin, Hypoxanthin und Xanthin bei Patienten mit AMP-Deaminasemangel und Vergleich zu Kontrollen mit normaler AMP-Deaminaseaktivität gemessen. Die Werte für Laktat, Inosin und Hypoxanthin lagen nichtsignifikant geringer bei Patienten mit AMP-Deaminasedefizienz im Vergleich zu Kontrollen mit normaler Aktivität (Wagner et al. 1991). Nach Laktat-Ischämietest wurden Adenosin, Inosin und Hypoxanthin im Plasma bei gesunden Kontrollen und Patienten mit AMP-Desaminasemangel und McArdle Erkrankung gemessen. Es konnte kein Unterschied im Plasmaadenosinanstieg zwischen den drei Gruppen gefunden werden (Sinkeler et al. 1986).

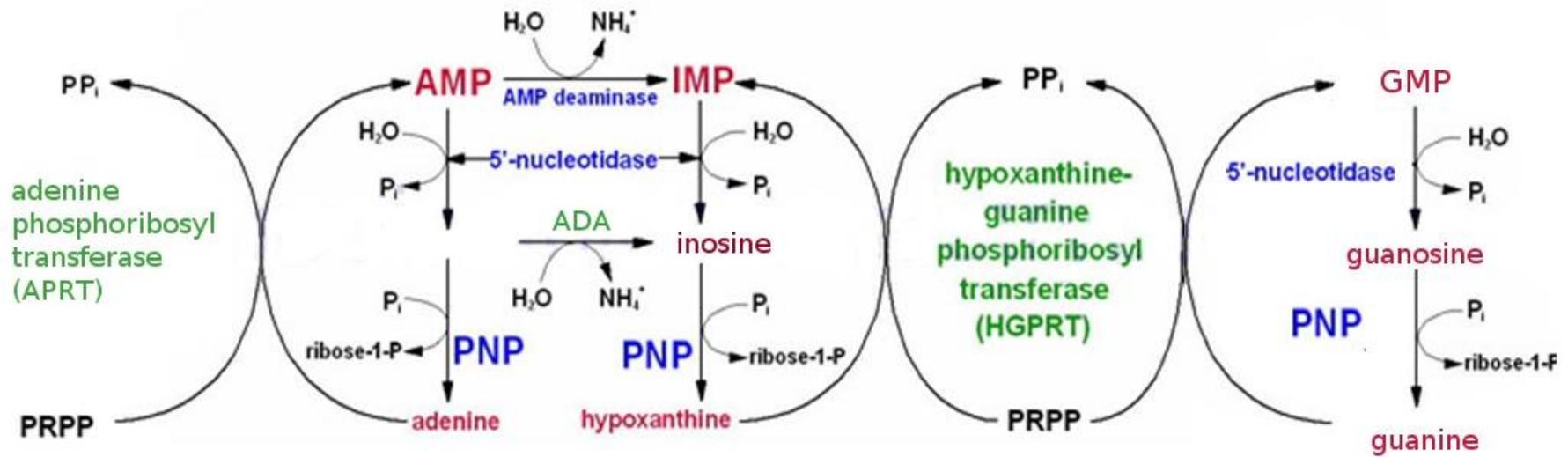
In einer anderen Studie wurde jedoch bei Personen mit einem biochemischen AMP-Deaminasemangel unmittelbar nach Belastung in einer Muskelstanzbiopsie ein 13-fach höherer IMP-Gehalt und ein 16-fach höherer Adenosingehalt sowie ein höherer Abfall des ATP im Vergleich zu Kontrollen mit AMP-Deaminaseaktivitäten im Normalbereich gefunden (Sabina et al. 1994). In einer späteren, ähnlich durchgeführten Untersuchung wurde bei homozygoten Probanden mit c.34C>T Mutation nach kurzzeitiger, hochintensiver Belastung ein Trend zu einer stärkeren Adenosinakkumulation

im Skelettmuskel im Vergleich zu Personen mit AMPD1 Wildtyp oder Heterozygotie für die c.34C>T Mutation gefunden. Außerdem wies der AMP Gehalt im Skelettmuskel nach Belastung keine signifikanten Unterschiede zwischen Homozygoten, Heterozygoten und Wildtyp auf (Norman et al. 2001).

Dies wurde als Argument einer Unterbrechung des Purinzyklus bei AMP-Deaminasemangel und für die Möglichkeit eines Umgehungskreislaufes angesehen. Die Daten ließen vermuten, dass im AMP-Deaminase defizienten Skelettmuskel der Abbau von AMP über das Enzym 5'-Nukleotidase vermehrt zu Adenosin abläuft. Dies kann potentiell durch eine Hochregulation der Enzymexpression oder eine erhöhte Substratbindungskapazität oder durch eine höhere Umsatzrate mittels vermehrter Substratverfügbarkeit erzielt werden.

Das Enzym 5'-Nukleotidase (EC 3.1.3.5) ist eine Phosphatase, die einerseits die Hydrolyse von AMP zu Adenosin und Phosphat als auch von IMP zu Inosin und Phosphat bewirkt (Abbildung 2). Im Skelettmuskel und im Herzmuskel wurden bislang drei Formen der 5'-Nukleotidase beschrieben: die membrangebundene Ecto-5'-Nukleotidase, und zwei lösliche zytosolische Formen, eine mit einer höheren Affinität zu AMP (zytosolische AMP-5'-Nukleotidase oder cN-I) und eine andere mit einer höheren Affinität für IMP (zytosolische IMP-5'-Nukleotidase oder cN-II) (Tullson et al. 1990, Bockmann und McKenzie 1993, Hellsten et al. 1999, Radegan und Hellsten 2000, Zimmermann 2000, Lynge et al. 2001). Die 5'-Nukleotidasen wurden jedoch im humanen Skelettmuskel bislang nicht beschrieben.

Abbildung 2. Alternativer Abbauweg des AMP über die zytosolische AMP-5'-Nukleotidase (aus: themedicobiochemistrypage.org).



2. ZIELSTELLUNG

Anhand der bisherigen Ausführungen lässt sich folgendes feststellen:

Eine homozygote c.34C>T Stop-Mutation im *AMPD1* Gen führt zu einem trunkierten, nichtfunktionierenden AMP-Deaminase-Enzym im Skelettmuskel. Diese Korrelation lässt sich biochemisch und histochemisch durch eine hochgradig verringerte Aktivität der AMP-Deaminase nachweisen, indirekt durch einen fehlenden Ammoniakanstieg im Laktat-Ischämie-Test. Die homozygote c.34C>T Mutation ist für fast alle bisher beschriebenen Fälle eines AMP-Deaminasemangels verantwortlich.

Aufgrund der Funktion des Enzyms wurde ein Phänotyp mit Myalgien und belastungsabhängigen Beschwerden postuliert. Da ein AMP-Deaminasemangel relativ häufig vorkommt und offensichtlich auch viele asymptomatische und sportliche Personen betrifft, konnte bislang kein klinischer Phänotyp dem AMP-Deaminasemangel zugeordnet werden, so dass der AMP-Deaminasemangel auch als harmloser Polymorphismus bezeichnet wurde.

Diese Diskrepanz aus genetisch/biochemischem Defekt und fehlender klinischer Korrelation bzw. Relevanz konnte bisher nicht aufgelöst werden. Überzeugende Beweise für Umgehungs- und Kompensationsmechanismen bei AMP-Deaminasemangel wurden bisher nicht erbracht.

Die folgende Arbeit untersuchte zunächst folgende Aspekte:

1. Unterscheidet sich die Häufigkeit mutierter Allele (bezogen auf die *AMPD1* c.34C>T Mutation) in unterschiedlichen Populationen, insbesondere stratifiziert nach gesunden Personen, Personen mit Myalgien und Personen mit definierten Myopathien?
2. Lassen sich innerhalb dieser drei Gruppen klinische Unterschiede finden, d. h. ist bei homozygoter c.34C>T Mutation ein klinischer Phänotyp abgrenzbar?

3. Gibt es alters- oder geschlechtsbezogene Unterschiede in der Expression der AMP-Deaminase?
4. Gibt es biochemisch und histochemisch Überlappungsbereiche zwischen c.34C>T Homozygoten und Heterozygoten?
5. Wenn ja, ist eine andere *AMPD1* Mutation im Sinne einer Compound Mutation dafür verantwortlich?

Außerdem wurden Umgehungskreisläufe und Kompensationsmechanismen untersucht: unter folgenden Fragestellungen:

6. Gibt es eine Korrelation zwischen Typ-I-Muskelfasern und der AMP-Deaminaseaktivität als Hinweis auf eine kompensatorische AMP-Deaminaseexpression anderer Isoformen (insbesondere Isoform E)?
7. Gibt es einen Anhalt für ein alternatives Spleißen des *AMPD1* Exon 2? Dies würde normale AMP-Deaminaseaktivitäten trotz Mutation bewirken.
8. Kompensatorisch könnte bei AMP-Deaminasemangel ein Abbau von AMP zu Adenosin durch 5'-Nukleotidasen eine Rolle spielen, deshalb untersuchten wir Unterschiede in der Expression und dem katalytischen Verhalten diverser 5'-Nukleotidasen im Skelettmuskel bei Personen mit unterschiedlichem *AMPD1* c.34C>T Genotyp. Nukleotidasen wurden bislang im humanen Skelettmuskel nicht charakterisiert.
9. Falls Ammoniak und Inosinmonophosphat tatsächlich positive Effektoren glykolytischer Enzyme bei kurzzeitigen, hochintensiven anaeroben Belastungen darstellen, müsste die Laktatproduktion im standardisierten Laktat-Ischämie-Test bei homozygoten *AMPD1* c.34C>T Mutationsträgern geringer ausfallen. Wir untersuchten dies.

3. PATIENTEN UND METHODEN

3.1 Patienten

Es erfolgte ein Screening von 294 Patienten auf die Mutation c.34C>T. Patienten, die homozygot für die Mutation c.34C>T waren, werden im Folgenden mit TT abgekürzt, Heterozygote für die Mutation c.34C>T mit CT und jene, die den Wildtyp aufwiesen mit CC.

Die Analyse umfasste zwei sich zum Teil überlappende Patientengruppen:

- (A) 174 konsekutive Patienten, die sich an der Klinik für Neurologie einer Musklebiopsie bei neuromuskulären Beschwerden unterzogen hatten.
- (B) 170 konsekutive Patienten, die sich einer Biopsie an der Klinik für Neurologie unterzogen hatten, aber hauptsächlich unter den Beschwerden Mylgien und Belastungsintoleranz litten.

Alle 294 Patienten wurden in zwei Kategorien unterteilt:

Die Kategorie „**erkrankt**“ beinhaltete Patienten mit einer definierten neuromuskulären Erkrankung zusätzlich zum *AMPD1* Genotyp. Dies beinhaltet 148 Patienten aus Gruppe A und B mit folgenden Erkrankungen:

- hereditäre Myopathien (n=116)
- inflammatorische und autoimmunvermittelte Myopathien (n=24)
- endokrinologische Myopathien (n=8)
- unklassifizierte Myopathien (n=12)

Die Kategorie „**gesund**“ umfasste Patienten mit den Beschwerden Myalgien und Belastungsintoleranz, bei denen zwar die Mutation c.34C>T identifiziert wurde, aber abgesehen davon keine neuromuskuläre Erkrankung diagnostiziert werden konnte. Bei diesen Patienten konnten keine Paresen und Atrophien in der klinisch-neurologischen Untersuchung identifiziert werden, die myohistologische Untersuchung wies normale oder unspezifische Befunde auf, die Serumkreatinkinase war im Normbereich und die EMG-Untersuchung zeigte ebenfalls Normalbefunde. Dies beinhaltete 75 Patienten aus Gruppe A und 146 Patienten aus Gruppe B.

Außerdem wurden Blutproben von 107 gesunden Blutspendern analysiert.

Für die Untersuchung der ecto- und zytosolischen 5'-Nukleotidase wurden aus dem oben geschilderten Kollektiv 41 Muskelbiopsien ausgewählt. Dies umfasste sechs Homozygote (TT), sieben Heterozygote (CT), 16 „erkrankte“ Kontrollen mit Wildtyp (CC) und 12 „gesunde“ Kontrollen mit Wildtyp (CC):

Für die Studie zum funktionellen Test mittels standardisiertem ischämischen Handkrafttest wurden ebenfalls aus dem oben genannten, als gesund charakterisierten Kollektiv 29 Personen mit folgenden Genotypen ausgewählt: Homozygote (TT, n=6), Heterozygote (CT, n=15) und Wildtyp (CC, n=8).

Die Einverständniserklärung aller Patienten zur Muskelbiopsie und zur molekulargenetischen Untersuchung lag vor.

Das positive Votum der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg lag ebenfalls vor.

3.2 Standardisierter Handkrafttest

Alle Personen waren nüchtern und hatten sich 12 Stunden vor Test keiner körperlichen Belastung unterzogen oder Nikotin und Kaffee konsumiert. Nach einer Ruhepause von 30 Minuten wurden Ruheserumspiegel von Laktat und Ammoniak bestimmt. Die Blutentnahmen erfolgten aus einer Flexüle aus der Vena cubitalis, die 30 min vor Beginn der Untersuchung in der Arm gelegt wurde, mit dem der Belastungstest durchgeführt wurde.

Die Testung erfolgte mit einem Handkraftmessgerät, das als Prototyp am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Universität Halle-Wittenberg entwickelt, hergestellt und gewartet wurde (Abb. 3A). Es besteht aus einem Handkraftdynamometer mit Kraftaufnahmesensoren, der mit einem Laptop verbunden war. Auf dem Laptop befand sich eine spezielle Software zur Registrierung und Auswertung (Data Acquisition Card: DAQCard-6024E, Data Acquisition Software: LabView). Auf dem Monitor konnten ein Arbeitsbereich, definiert durch die individuelle Maximalkraft, eine Taktgebung (akustisches Feed Back) und die Dauer der Testung programmiert werden (Abbildung 3). Bereits im Vorfeld waren mehrere unterschiedliche Protokolle in

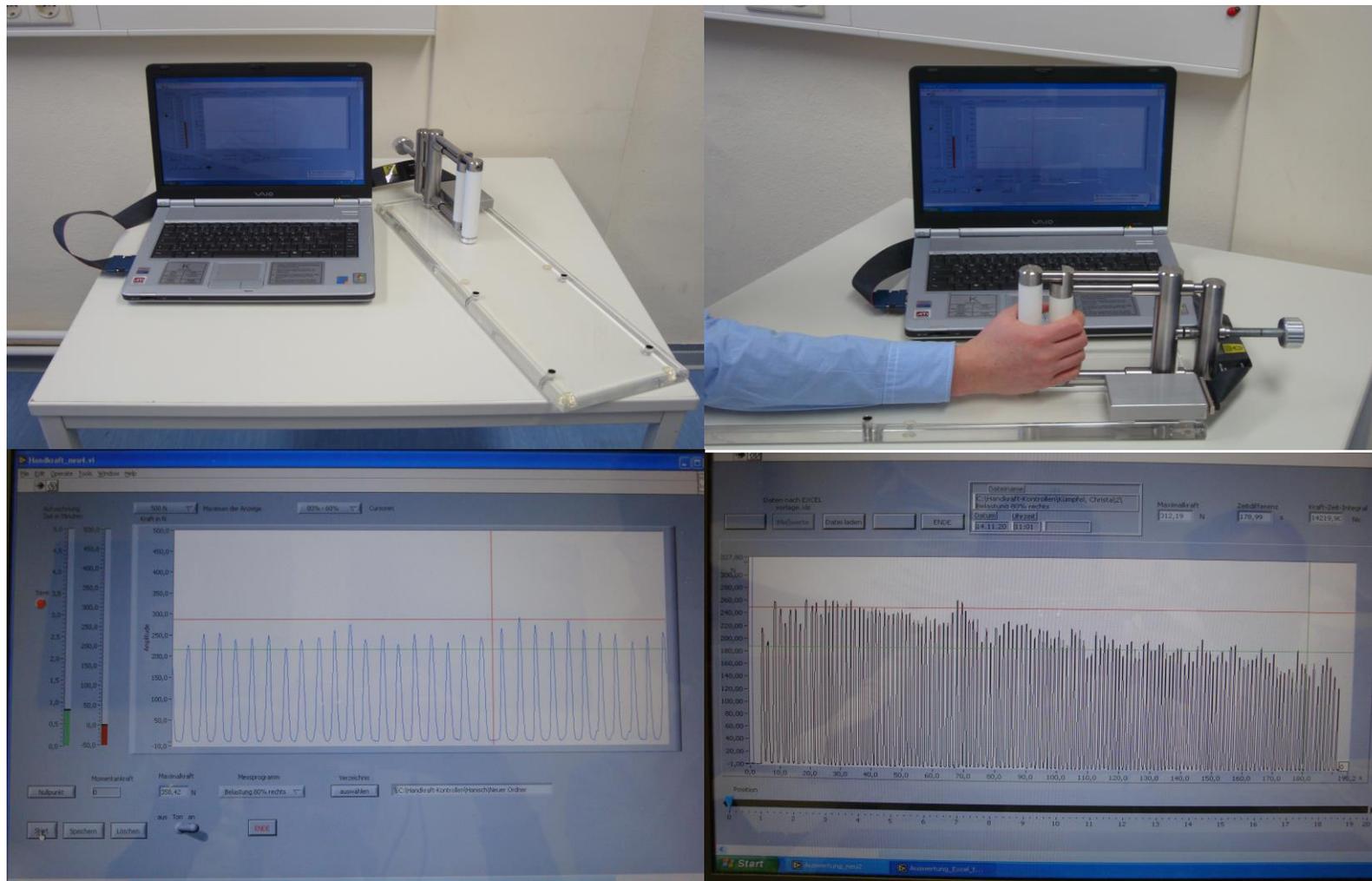
Untersuchungen mit Patienten mit Myopathien validiert worden: intermittierender isometrischer Handkraftexercice mit 0.5 Hz bei 80% der maximalen Kontraktionskraft für 3 Minuten und 30% der MCF für 3 und 15 Minuten unter aeroben Bedingungen (Hanisch et al. 2006a). Damit wurde die Sauerstoffdesaturation bei Mitochondriopathien untersucht. In einer weiteren Untersuchung wurde die Laktatproduktion bei Patienten mit Myopathien und gesunden Kontrollen im klassischen anaeroben Test (ischemic forearm exercise test, IEFT) bei 80% der MCF für 1 Minute mit einem Protokoll unter aeroben Bedingungen verglichen (Hanisch et al. 2006b, Hanisch et al. 2006c).

Die Einstellung des Handgriffs wurde an die Handgröße angepasst. Die maximale Kontraktionskraft (maximal contraction force, MCF) wurde dreimal vor der Anlage der Flexüle bestimmt. Der höchste MCF Wert wurde als Referenzwert genommen.

Jeder Proband führte nach standardisiertem Protokoll bei 1.0 Hz isometrische rhythmische Kontraktionen bei 80% der jeweiligen eigenen MCF für 1 Minute durch (Hanisch et al. 2006). Die Patienten konnten ihre geleistete Kontraktionskraft anhand von Ausschlägen auf dem Monitor sehen und ihre Arbeit dahingehend kontrollieren. Der Arbeitsbereich lag bei 60-80% der MCF (Abbildung 3B und 3C). Während der einminütigen Testung war die Sphygomanometermanschette um den Oberarm auf 20 mm Hg über den systolischen Blutdruckwert aufgepumpt, um quasi ischämische Verhältnisse im Drainagegebiet des arbeitenden Muskels zu erzielen. Die Blutproben (Laktat, Ammoniak) wurden aus der V. cubitalis des arbeitenden Armes entnommen unmittelbar vor Beginn der Arbeit, unmittelbar am Ende der Testung (Zeitpunkt 1 Minute) und nach 2, 3 und 5 Minuten. Kein Teilnehmer unterbrach die Testung.

Die Kontraktionskraft wurde aufgezeichnet und die geleistete Arbeit post hoc als Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) mit dem Auswerteprogramm bestimmt (Abbildung 3D). Die Laktatbildung bzw. Ammoniakbildung wurde auf die geleistete Arbeit bezogen und dann spezifische Laktatproduktion und spezifische Ammoniakproduktion genannt (z. B. spezifische Laktatproduktion = Δ Laktat / AUC).

Abbildung 3. Das Handkraftmessgerät. **(A)** Handkraftdynamometer mit Kraftaufnehmer und Monitor. **(B)** Versuchsaufbau. **(C)** Monitor mit Darstellung des Arbeitsbereiches und den Amplituden. **(D)** Fläche unter der Kurve im Auswerteprogramm.



3.3 Muskelbiopsie und Asservierung des Materials

Zur histopathologischen Aufbereitung wurde die entnommene Muskelprobe mit Hilfe eines speziellen Einbettmediums (Tissue Freezing Medium, Fa. Jung) auf einer ca 1cm großen Korkunterlage fixiert und unter Zuhilfenahme einer langen Pinzette zuerst für 30 s in ein mit -80°C Isopenthanlösung gefülltes Gefäß getaucht, das unmittelbar vorher in flüssigem Stickstoff abgekühlt wurde. Anschließend wurde die Probe für ca. 60 s in ein mit -196°C gefülltes Gefäß mit flüssigem Stickstoff getaucht, bis die optimale und durchgehende Gefrierung gewährleistet war. Die vorhergehende Behandlung mit Isopenthan macht das Verfahren schonender und weniger anfällig für Gefrierartefakte. Im Anschluss wurde jeder Muskel einzeln in 5 ml grosse, beschriftete Plastikbehälter (Sample Vial LDPE; Nalgene) verpackt und in flüssigem Stickstoff bei konstanten -196°C in Tanks mit flüssigem Stickstoff im Muskellabor der Universität Halle-Wittenberg aufbewahrt.

3.4 Histochemische Untersuchungen

3.4.1 myofibrilläre ATPase (pH 9.4) Färbung

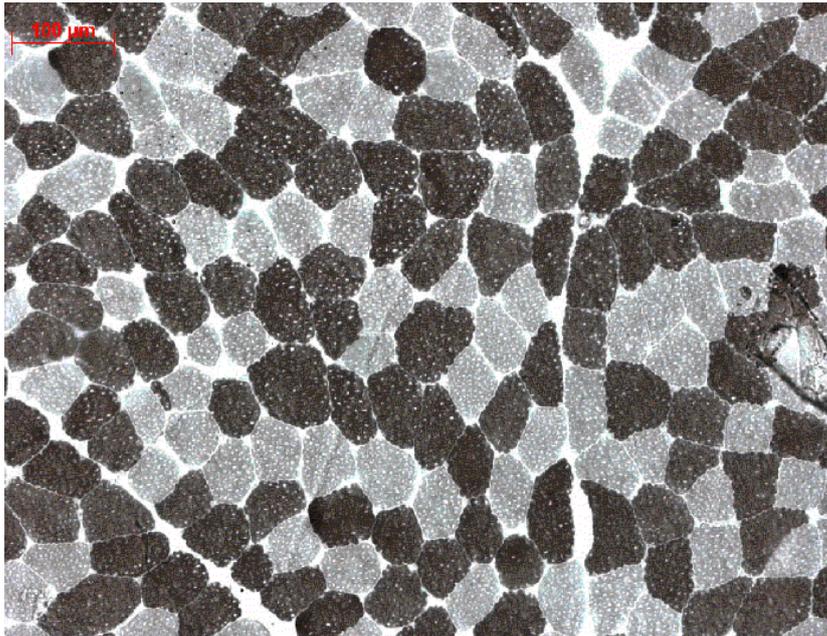
Um die Verteilung der oxidativen Typ-I und glykolytischen Typ-II Muskelfasern zu analysieren, wurde die myofibrilläre ATPase (pH 9.4) Färbung verwendet (Rohnd et al. 1980). Die myofibrilläre ATPase Reaktion macht das bei der Umwandlung entstehende Phosphat sichtbar. Bei der hier verwendeten Präinkubation von pH 9,4 weisen Typ-I-Fasern eine hellbraune, Typ-II-Fasern im allgemeinen eine dunkelbraun bis schwarze Färbung auf (Abbildung .4).

Protokoll

1. ATPase Inkubationslösung herstellen und bei 37°C 1h vorwärmen
2. $5\mu\text{m}$ Schnitte in ATPase pH 9,4 geben und 15min inkubieren
3. jeweils 3 x 1min in Calciumchlorid geben
4. 5min in Cobalt (II)-chlorid (10g Cobalt (II)-chlorid/ 500ml Aquadest) belassen
5. 4x spülen in 0,01m Natrium- Barbitat- Lösung (0,1M Natrium Barbitallösung 1:10 verdünnen mit Aquadest
6. 15-60 s Spülen in Leitungswasser

7. 20s in Amoniumsulfid (5ml 20%iges Amoniumsulfid in 95ml Aquadest) belassen
8. Waschen und Einstellen in Aquadest
9. Eindecken mit Kaiser´s Glycingelatine

Abbildung 4. Darstellung von oxidativen Typ-I-Muskelfasern (hell) und glykolytischen Typ-II-Muskelfasern (dunkel) mit erhaltenem Mosaikmuster.



3.4.2 p-Nitroblau Tetrazoliumfärbung zur histochemischen AMP-Deaminase Darstellung

Die Kriterien für eine pathologische histochemische Darstellung der AMP-Deaminase sind die abnorm niedrige Färbeintensität bzw. gänzlich fehlende Anfärbung und der daraus resultierende Verlust einer Darstellbarkeit von Typ-I und Typ-II Muskelfasern.

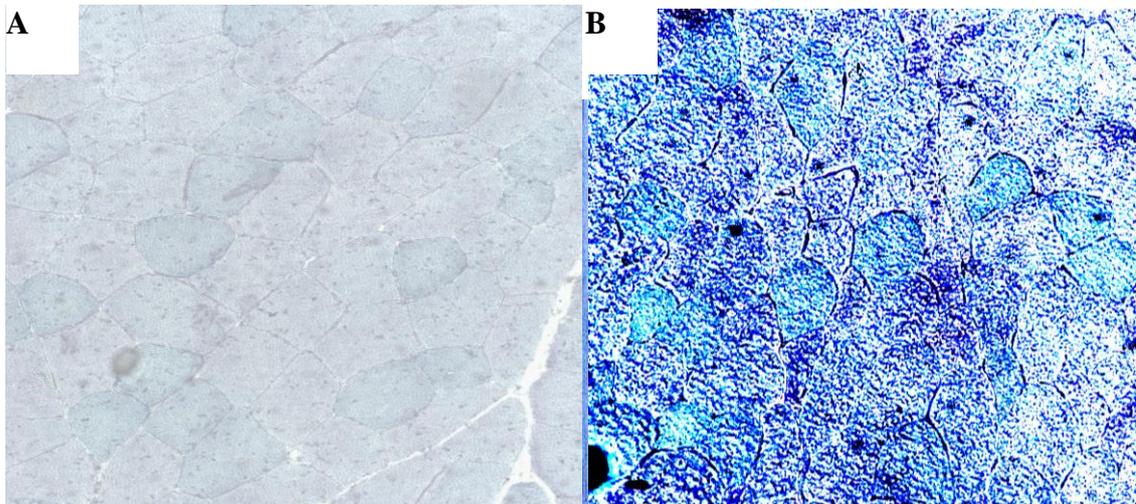
In Anwesenheit von p-Nitroblau-Tetrazolium, AMP und Kaliumchlorid wird die AMP Deaminase aktiviert. Der aus der Bildung von Ammoniak resultierende Anstieg des pH katalysiert die Tetrazoliumreaktion, bei der der blaue Farbstoff Formazan entsteht, der das Gewebe anfärbt. Typ-I-Fasern zeigen viele granuläre blaue Densitäten auf einem klaren zytoplasmatischen Hintergrund und Typ-II-Fasern zeigen wenige granuläre blaue Densitäten auf einem pinken

zytoplasmatischen Hintergrund. Allerdings ist die Fasertypendiskriminierung oft nur eingeschränkt mit dieser Färbung möglich (Abbildung 5). Die Unterscheidung zwischen einem CC Wildtypstatus und einem TT Homozygotenstatus lässt sich mit großer Trennschärfe treffen, bei CT Heterozygoten können sich intermediäre Intensitäten, aber trotzdem ganz eindeutig positive Darstellungen erzielen lassen.

Protokoll der AMP-Deaminasefärbung

1. Inkubation in AMP-Deaminaselösung bestehend aus 3.6 mM Adenosin-5'-Monophosphat, 4.5 mM p-Nitroblau-Tetrazolium, 9.6 mM Dithiothreitol für 45 min bei 37 °C
2. Waschen und Einstellen in Aquadest
3. Eindecken mit Kaiser's Glyceringelatine

Abbildung 5. p-Nitroblau Tetrazoliumfärbung zur histochemischen AMP Deaminase Darstellung. **(A)** Darstellung bei homozygoter c.34C>T Mutation (TT). **(B)** Darstellung bei CC Wildtyp.



3.5 Biochemische Untersuchungen

3.5.1 Die biochemische Bestimmung der AMP-Deaminaseaktivität

In Flüssigstickstoff gelagerter Muskel wurde homogenisiert (1:30 w/v) in Chappel-Perry Medium A Puffer (pH 7.5), der sich zusammensetzte aus 7.5 mM KCl, 6.0 mM Tris, 1.0 mM MgCl₂ und 0.4 mM EGTA. Die AMP Deaminasebestimmung erfolgte nach der modifizierten Methode nach Zöllner et al. (1986). Das Endvolumen von 1000 µl enthielt 250 mM Imidazolpuffer (pH 6.5), 0.1 M KCl, 0.04 M MgCl₂, 6mM α-Ketoglutarate, 20 µl Glutamatdehydrogenase (1:5 Aqua bideest), 0.15 mM NADPH und jeweils 5 µl, 10 µl oder 20 µl Muskelhomogenat. Die Reaktion wurde initiiert, wenn 7.5 mM AMP hinzugefügt wurde. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Jede Messung wurde zweimal wiederholt.

3.5.2 Die biochemische Bestimmung der zytosolischen 5'-Nukleotidaseaktivität (cN-I)

Die Nukleotidasefraktionen aus dem Gesamthomogenat beinhalteten die Ekto-5'-Nukleotidase und die zytosolische Gesamt 5'-Nukleotidase. Die zytosolische Gesamt 5'-Nukleotidase setzt sich zusammen aus (1) der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase (cN-I), (2) der zytosolischen IMP 5'-Nukleotidase (cN-II) und unspezifischen Phosphatasen. Die Muskelproben werden in Puffer homogenisiert (1:20 w/v), der 20 mM Tris-HCl, 250 mM Sucrose, 0.2 mM Na-EDTA, 0.5 mM MgCl₂ und die Proteaseinhibitoren Leupeptin, Aprotinin, und Benzamidin enthält. α-Glyzerophosphat wurde während der Messung dazugegeben, um den Beitrag unspezifischer Phosphatasen zur Adenosinbildung zu unterdrücken (Newby et al. 1975). Die Trennung der zytosolischen Fraktionen des Homogenates (cN-I und cN-II) wurde nach der Methode von Cheng et al. (2000) ausgeführt. Dabei wird das Homogenat bei 900 g für sieben Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird dann bei 77 000 g für 60 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zytosol dieser Fraktion wird mit dem der vorherigen Zentrifugation vereinigt und bei -80°C bis zur Analyse gelagert.

Die zytosolische AMP 5'-Nukleotidase (cN-I) und der Proteingehalt wurde in Gesamthomogenaten als auch in kombinierten zytosolischen Fraktionen gemäß

der Methode nach Hellsten et al. (1999) bestimmt. Die Aktivität der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase (cN-I) wurde in einem Puffer gemessen, der 20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.4 mM Na-EDTA, 50 mM α -Glycerophosphat, 50 μ M Coformycin und 5 μ M Erythro-9-(2-Hydroxy-3-Nonyl)-Adenin (EHNA) bei pH7.4 enthielt. Die Reaktion wurde initiiert durch Zugabe von AMP bei Konzentrationen zwischen 0.01 und 2 mM und wurde für zehn Minuten bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde terminiert durch Zugabe von Perchlorsäure. Adenosin wurde gemessen mittels Reversed-Phase Chromatographie (Tullson und Terjung 1999).

Die 5'-Nukleotidaseaktivität wurde gemessen und bezogen auf das Gesamtproteinhomogenat, d.h. das Homogenat vor der Trennung in die zytosolische Fraktion mittels Zentrifugation sowie auf das zytosolische Protein. Die Ekto-Nukleotidase wurde dann berechnet als die Differenz zwischen der Gesamt 5'-Nukleotidase im Homogenat und der gesamten zytosolischen Aktivität bezogen auf das Gesamtproteinhomogenat.

3.6 Western Blot Untersuchungen

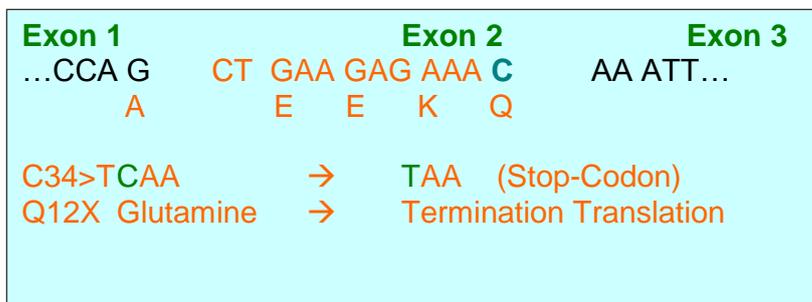
Homogenisierte Proteine wurden mittels 10%igem SDS Polyacrylamidgel (50 μ g pro Tasche) getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-PR, Amersham Biosciences, UK) transferiert. Der Western Blot erfolgte mit dem cN-I-Antikörper - der von Frau Dr. Sally Hunsucker, University of Carolina, USA, zur Verfügung gestellt wurde - in einer Verdünnung von 1:250 und sekundärem Meerrettichperoxidase-konjugiertem Anti-Kaninchen-Antikörper (Amersham Biosciences) in einer Verdünnung mit 1:5000. Die Banden wurden mittels verstärkter Chemolumineszenz (enhanced chemoluminescence, ECL) (Amersham Biosciences) visualisiert. Die cN-I Bande wurde bei 40 kDa erwartet (Hunsucker et al. 2001).

3.7 Molekulargenetische Untersuchung

3.7.1. Genetische Analyse der c.34C>T Mutation

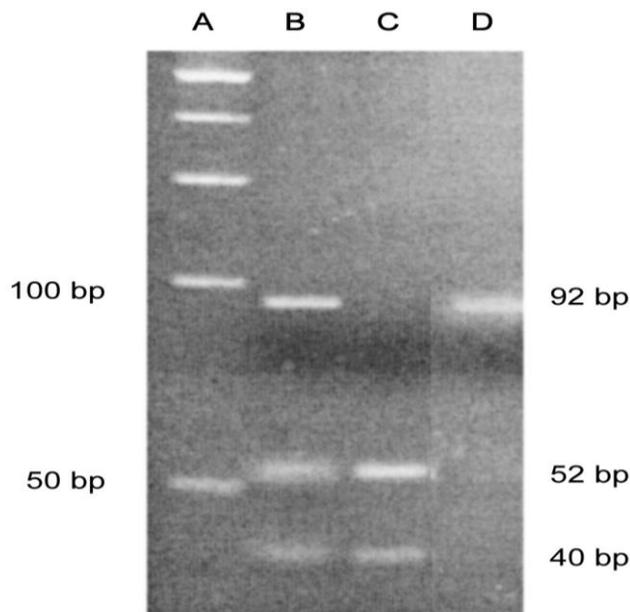
Wenn die *AMPD1* c.34C>T Mutation, eine Punktmutation auftritt, wird im 1. Basenpaar des letzten Triplets im Exon 2 C durch T ersetzt. Dies führt zu einer Translation von Glutamin, sondern zum Ablesen eines Stop-Codon und zur Termination der Translation (Abbildung 6)

Abbildung 6. Darstellung des Effektes der c.34C>T Mutation. :



Genomische DNA wurde aus frischem EDTA Blut isoliert. Exon 2 des *AMPD1* wurde mit seinen flankierenden intronischen Regionen amplifiziert mittels PCR unter folgenden Bedingungen: Vorwärtsprimer: 5'-TGT TCA CAT ATT TTA TCT TG, Rückwärtsprimer: 5'-ATA CTC TGA CAA ATG GC; Annealing-Temperatur 45°C, 30 Zyklen; MWG, München). Die Amplifizierung erfolgte mit GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA). Die PCR Produkte wurden auf ein 8%iges Gel aufgetragen um das zu erwartende 92 Basenpaar große Produkt zu visualisieren. Diese Amplifikate wurden über Nacht bei 50°C mit dem Restriktionsenzym *Maell* inkubiert, welches das normale (=Wildtyp) Exon spaltet, indem es die Sequenz ACTG erkennt. Die Mutation c.34C>T verändert jedoch die Sequenz dieser Schnittstelle, so dass das mutierte Allel nicht gespleißt wird. Schließlich wurden die inkubierten PCR Produkte wiederum auf ein 8%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, um den Genotyp wie folgt zu bestimmen: TT weist eine 92-Basenpaar Bande auf, CT jeweils eine Bande von 92 Basenpaaren und 52 Basenpaaren, CC nur eine Bande bei 52 Basenpaaren (Abbildung 7). Die Aufnahme der Gele erfolgte mit Gen Flash Syngene Bioimaging (VWR International, Österreich).

Abbildung 7. 8%iges Polyacrylamidgel mit aufgetrennten PCR Produkten: CT mit jeweils einer Bande von 92 Basenpaaren und 52 Basenpaaren (Bahn B), CC mit einer Bande bei 52 Basenpaaren (Bahn C), TT mit einer 92-Basenpaar Bande auf (Bahn D). Bahn A = 50 bp DNA Marker.



3.7.2 Genetische Analyse der c.468G>T Mutation

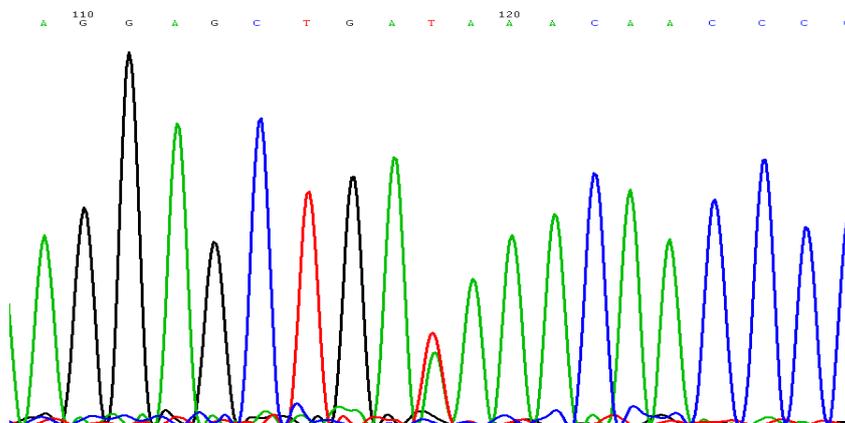
In vorherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass auch die *AMPD1* Mutation c.468G>T die AMP-Deaminaseaktivität vermindern kann (Gross et al. 2002). Tritt diese Punktmutation auf, wird in Position 468 die Base G durch T ersetzt in der 3. Triplettsposition. Dies führt zum Austausch von Glutamin durch Histidin, das eine andere Imidazoleitengruppe aufweist. Um diese ursächliche Möglichkeit einer verminderten AMP-Deaminase auszuschließen, wurde auch das Exon 5 des *AMPD1* amplifiziert unter folgenden Bedingungen: Forwärtsprimer: 5'-TTT GGC AGG TTA CAG TTG AAG A, Rückwärtsprimer: 5'-TTG GAA GGG GTT TTA GGG AAC AT; Annealing-Temperatur 55°C, 20 Zyklen, MWG). Diese Untersuchung erfolgte bei allen Patienten mit CT (n=63) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf ein 8%iges Gel aufgetragen, um das zu erwartende 118-bp Produkt zu visualisieren. Amplifikate wurden mittels Einzelstrang-Analyse (Single-Strand-Analysis) sequenziert und auf die c.468G>T Mutation gescreent (Chromas Version 2.01, Technelysium).

3.7.3 Genetische Analyse der c.860A>T Mutation

Alle 107 Blutspender und alle 63 CT Fälle wurden auf die c.860A>T Mutation untersucht. Bei dieser Punktmutation kommt es zum Austausch der Base A durch T in Position 2 des Triplets und damit zum Ersatz von Lysin durch Isoleucon in der Aminosäureposition 287 (K287I) (Isackson et al. 2005).

Die PCR Untersuchung erfolgte unter folgenden Bedingungen mit 30 Zyklen bei 61°C: Forwärtprimer: GAG ATG GAC GAG TTA AAG GAG CTT A, Rückwärtprimer mit Mismatch: CTT AAC CCT AAC CCA TTG GAC A. Das PCR Produkt wurde bernacht bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *PsiI* (invitrogen, Carlsbad, USA) verdaut. Anschließend wurde die Probe auf ein 8%iges Gel aufgetragen und das Ergebnis mittels Sequenzierung überprüft (Abbildung 8).

Abbildung 8. Darstellung einer heterozygoten c.860A>T Mutation (A grün, T rot).



3.7.4 Genetische Analyse des gesamten *AMPD1*

Die Sequenzierung des gesamten *AMPD1* mit 16 Exonen erfolgte bei 4 CT und drei CC mit den niedrigsten AMP-Deaminaseaktivitäten. 2/7, darunter ein CC hatten eine reduzierte histochemische AMP-Deaminasefärbung, 2/7 hatten als einzige Beschwerden Myalgien und belastungsabhängige Beschwerden, darunter ebenfalls ein CT. Die verwendeten 16 intronischen Primerpaare zur Sequenzierung des *AMPD1* sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Table 1. Auflistung der 16 intronischen Primerpaare zur Sequenzierung des *AMPD1*

Exon	Forward primer	Reverse primer
1	cag tca ccc cac agt ctc ct	caa caaa caa ctg agc tct cca
2	tgt tca cat att tta tct tg	ata ctc tga caa atg gc
3	ggc ttg aac act aat atg tg	ata cta agc act ccc ctt ac
4	tga aac gcc tga tga aga ca	tgg ctt cct ggt tgc taa gt
5	tgc gat aca cag gag agc tg	tga ttg gac acg tga gga aa
6	acc gga ttc caa gct aat ga	caa tgt gca tga agg gct ta
7	gaa tgc ctg aaa ctt ttt gga	aac cct aac cca ttg gac ata a
8	gac cac ctc cac caa ctg tc	cgt ggt aag cca aga tgg tt
9	tca cct ctg tcc caa att cc	cta cct cct gca aag cca ag
10	aat ccc tgg ctt gga ctt ct	ggg gac ttg aag cag atg ag
11	ccc tca tac tgg ggc tat ca	acc agg tag gaa ggc tgg tt
12	agt tgg act gaa ccc att gc	tcc tag ctc cag ctg tct cc
13	tcc ttc cag agt gtt cac ttt tc	ttg cag tgt cga taa tga ctt gt
14	agc tta agg cag acc atg aga	tca aat tct gga cgg gaa ac
15	ttt tca ggc agg atg cat att a	ccc aac tac ttt ttc ggt att ca
16	gag gca cta gat ggg tgc tt	tgg aac atc taa tac ttt cct tgg

Die Cycle-Sequenzierung wurde mit dem BigDyeR Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Hercules, USA) durchgeführt. Zuvor wurden die zu sequenzierenden PCR-Produkte gereinigt (Montage PCR Filter Units, Millipore, USA). Die Sequenzierung der Proben erfolgte automatisch mittels Laserfluoreszenz-Detektionstechnik (ABI Prism 310, Applied Biosystems, Hercules, USA). Diese Untersuchung erfolgte am Zentrum für medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Universität Halle-Wittenberg. Die Sequenzen wurden auf das Vorliegen von Mutationen gescreent mittels Chromas Version 2.01, Technelysium.

3.8 Statistische Analyse

Die Herstellung der graphischen Darstellungen (Diagramme) erfolgte mit dem Programm SigmaPlot (Version 9.0, Schweiz).

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SigmaStat (Version 3.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Die Werte sind in der Regel als Mittelwerte \pm 1 Standardabweichung (SD) und dem Bereich in Klammern (Minimum-Maximum) angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei einem $p < 0.05$ akzeptiert.

Die Daten wurden mittels des Normalitätstests nach Kolmogorov-Smirnov auf Normalverteilung getestet.

Die statistische Analyse erfolgte mit dem unpaarigen t-Test bei parametrischen Datensätzen und dem Wilcoxon Rank Sum Test bei nichtparametrischen Datensätzen.

Es wurde die einfache lineare Regression bestimmt und der Pearson Produkt Moment Korrelation berechnet.

Bei der Analyse der Gruppen mit unterschiedlicher Allelfrequenz kamen der χ^2 -Test und der Fisher Exact Test zur Anwendung.

Wurden mehrere Gruppen miteinander verglichen (wie bei den Werten zum Laktat-Ischämie-Test), wurde die One-Way-ANOVA Varianzanalyse durchgeführt. Die post-hoc Analyse nach der One-Way-ANOVA Varianzanalyse wurde mit dem Tukey Test durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Kohortenuntersuchung

Es konnten zwischen CC, CT und TT aus den Gruppen A und B keine Unterschiede gefunden werden im Vorkommen von Myalgien, Belastungsintoleranz, Parese, HyperCKämie, pathologischen Veränderungen in der Muskelbiopsie, pathologischen EMG Veränderungen und anderen definierten neuromuskulären Erkrankungen (Tabelle 2). Bei 3 von 13 TT Patienten wurde eine andere neuromuskuläre Erkrankung gefunden (autosomal-dominante Muskeldystrophie Hauptmann-Thannhauser mit dystrophen Veränderungen in der Muskelbiopsie, Gliedergürteldystrophie Typ 2A und Myopathie bei schwerer Schilddrüsenüberfunktion mit geringfügigen Veränderungen in der Muskelbiopsie). Weitere drei Patienten mit TT hatten eine HyperCKämie, für die keine Ursache in Form einer neuromuskulären Erkrankung gefunden wurde. Einer dieser Patienten hatte geringfügige myopathische Veränderungen in der Muskelbiopsie.

Die Mutationsanalyse aller 401 DNA Proben zeigte eine Häufigkeit des mutierten Allels von 13.3 – 16.8%, wobei es keine statistischen Unterschiede in der Häufigkeit bei Blutspendern, Patienten mit definierten neuromuskulären Erkrankungen oder Patienten mit belastungsabhängigen Beschwerden ohne Anhalt für eine Myopathie (Tabelle 3) gab. Unter diesen 294 Patienten wurden 63 CT und 13 TT identifiziert.

Mittels biochemischem Assay konnte bei 88 CC, 51 CT und 13 TT die AMP-Deaminaseaktivität gemessen werden. Verglichen mit dem Mittelwert der AMP-Deaminase bei CC betrug der Mittelwert der CT 44% und der Mittelwert der CT 5.6%. Diese Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch signifikant ($p < 0.001$). Die AMP-Deaminaseaktivitäten zeigten eine beträchtliche Überlappung bei zwischen CC und CT, aber nicht mit TT (Abbildung 9). Die biochemische AMP-Deaminaseaktivität war nicht unterschiedlich in Individuen mit einer definierten neuromuskulären Erkrankung und jenen mit belastungsabhängigen Beschwerden ohne Anhalt für eine Myopathie bei TT,

CT und CC (Abbildung 9). Für den TT genotyp wies die biochemische AMP-Deaminaseaktivität eine Sensitivität als auch Spezifität von jeweils 100% auf.

Es gab keine Korrelation zwischen dem Alter und der biochemischen AMP-Deaminaseaktivität bei TT, CT und CC. Es gab keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der AMP-Deaminaseaktivität.

Table 2. Klinische, elektrophysiologische und histologische Parameter der Patienten aus Gruppe A (174 konsekutive Patienten, die sich einer Muskelbiopsie aufgrund neuromuskulärer Beschwerden unterzogen). Es gab keine Unterschiede in der Häufigkeit der Beschwerden und klinischen Symptome zwischen CC, CT und TT (chi²-Test und Fisher exact Test).

	TT (n = 6)		CT (n = 38)		CC (n = 130)	
	n	%	n	%	n	%
Männer/Frauen	3/3		16/22		65/65	
Myalgie	2	33	12	32	40	31
Belastungsintoleranz	2	33	15	39	49	38
Paresen	2	33	8	21	32	25
Myoglobinurie	0	0	2 ¹	5	1 ²	0.8
HyperCKämie	3	50	14	37	45	35
myopathisches EMG	3	50	15	39	37	28
Biopsiebefunde						
normal	3	50	19	50	73	56
myopathisch	3	50	14	37	43	33
myositisch	0	0	4	11	11	9
neurogenisch	0	0	1	2.6	5	4
definierte neuromuskuläre	3	50	19	50	77	59

¹ medikamenteninduziert und McArdle Glykogenose Typ V

² medikamenteninduziert

Die c.860A>T Mutation wurde bei 6/107 Blutspendern gefunden (Häufigkeit des mutierten Allels 2.8%) und bei 1/63 CT (entspricht einer Häufigkeit des mutierten Allels von 0.8%). In letzterem Fall betrug die AMP-Deaminaseaktivität 71.7 U/g NCP. Keiner der Blutspender war compound heterozygot für die c.34C>T und c.860A>T Mutation. Bei keinem der heterozygoten (CT) Patienten konnte die c.468G>T Mutation identifiziert werden. Das Screening des gesamten *AMPD1* erbrachte außer der bereits identifizierten c.860C>T Mutation keine neuen Befunde.

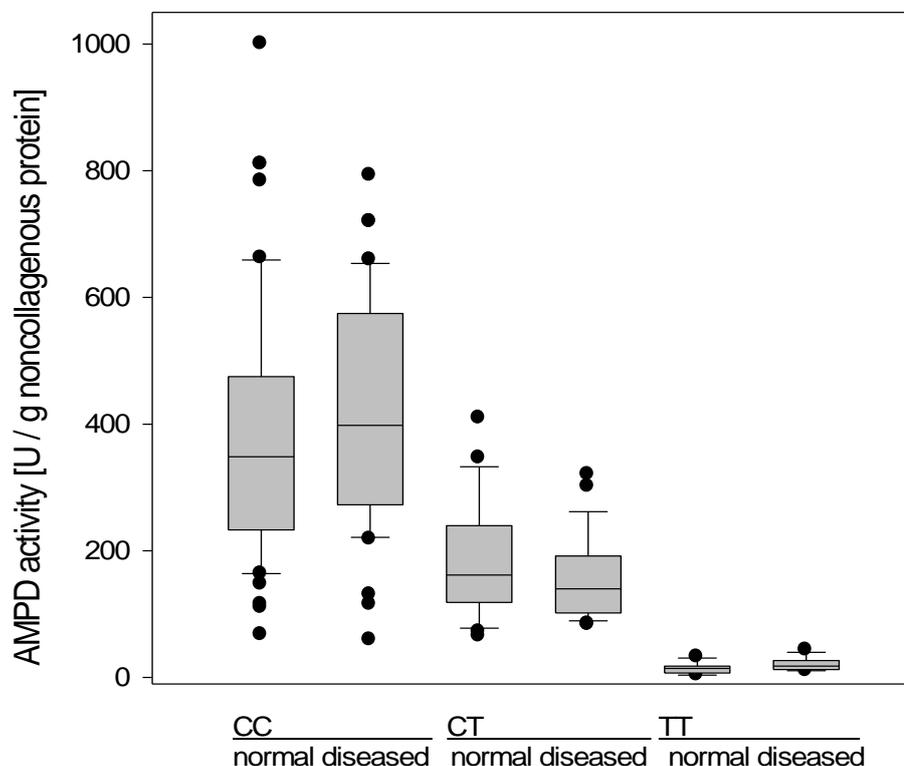
Table 3. Verteilung der c.34C > T Mutation in verschiedenen Kohorten. Es gab keinen Unterschied zwischen den drei Kohorten hinsichtlich der Häufigkeit des mutierten Allels (mutant allele frequency (MAF)) und der Genotypverteilung (χ^2 -Test und Fisher exact Test).

	n	TT (%)	CT (%)	CC (%)	MAF (%)
Konsequente Blutspender	107	2.5	25.6	71.9	16.8
Konsequente Patienten mit Muskelbiopsie (Gruppe A)	174	3.4	21.8	74.8	14.3
Patienten mit belastungsabhängigen Beschwerden ohne Anhalt für definierte Myopathie (Untergruppe der Gruppe B)	146	4.1	18.5	77.4	13.3

Die Analyse von 147 Objektträgern mit der histochemischen AMP-Deaminasefärbung bot eine Sensitivität von 86% und eine Spezifität von 98% für die Erkennung eines AMP-Deaminasemangels infolge einer homozygoten c.34C>T Mutation. Drei Objektträger (1/101 CC, 2/36 CT) zeigten auffällige Ergebnisse mit einer pathologisch erniedrigten AMP-Deaminasefärbeintensität. Nur 1/14 TT hatte eine positive Färbeintensität mit abgrenzbaren Typ-I und Typ-II Fasern.

Letztlich konnte histochemisch mit Hilfe der AMP-Deaminasefärbung nicht zwischen Heterozygotie (CT) und dem Wildtyp CC unterschieden werden.

Abbildung 9. AMP-Deaminaseaktivitäten in gesunden und erkrankten Personen bezogen auf den c.34C > T Genotyp (CC und TT: Student's t-Test, CT: Man-Whitney-rank-Sum-Test). Die Genotypen wurden unterteilt in gesunde und erkrankte (mit einer neuromuskulären Erkrankung) Kohorten. Die Werte beziehen sich auf einen Mittelwert \pm Standardabweichung (Bereich in Klammern). NCP nichtkollagenes Protein.



4.2. Ergebnisse der Untersuchung der Nucleotidasen

Die Aktivität der AMP-Deaminase war signifikant unterschiedlich zwischen Personen mit TT, die 8% der mittleren Werte von Wildtypkontrollen aufwiesen, Personen mit CT, die 36% der mittleren Werte von Wildtypkontrollen aufwiesen, und Personen mit CC (Wildtyp). Es konnte kein Unterschied in der AMP-Deaminaseaktivität zwischen erkrankten und gesunden CC Personen gefunden werden (Tabelle 4): Eine Compoundheterozygotie für die c.468G>T Mutation war bei keiner der CT Personen zu finden, aber bei einer CC Person mit abnorm niedriger AMP Deaminaseaktivität.

Die Gesamtaktivität der zytosolischen Nucleotidase gemessen an der 5'-Nucleotidaseaktivität im Gesamthomogenat machte $57 \pm 22\%$ bei gesunden CC, $42 \pm 16\%$ bei erkrankten CC, $47 \pm 17\%$ bei CT und $55 \pm 32\%$ bei TT aus. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den 4 Gruppen. Es gab jedoch eine signifikante positive Korrelation zwischen der zytosolischen AMP-5'-Nucleotidase (cN-I) Aktivität und der Aktivität der 5'-Nucleotidase im Gesamthomogenat ($p < 0.001$, $r^2 = 0.747$).

Die K_m -Werte für AMP, gemessen mit gepoolten zytosolischen Nucleotidasefraktionen, betrug 0.40 mM in TT, 0.39 mM in CT und 0.27 mM in CC. Die zytosolischen AMP-5'-Nucleotidase (cN-I) Aktivität bezogen auf zytosolisches Protein (Tabelle 4) war ungefähr dreifach höher als die zytosolischen AMP-5'-Nucleotidase (cN-I) bezogen auf homogenisiertes Protein (Daten nicht gezeigt). Die Ursache dafür liegt in der höheren spezifischen Aktivität der gereinigten Fraktion. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Aktivitäten der zytosolischen AMP-5'-Nucleotidase (cN-I), der Gesamt zytosolischen Nucleotidase, der Ekto-Nucleotidase und der 5'-Nucleotidaseaktivität im Gesamthomogenat für die unterschiedlichen *AMPD1* Genotypen (n.s., Tabelle 1).

Eine schwache umgekehrte Korrelation bestand zwischen der zytosolischen AMP-5'-Nucleotidase (cN-I) Aktivität und der AMP Deaminaseaktivität ($r = -0.43$, $r^2 = 0.18$, $p < 0.01$, Power 0.8, Abbildung 10). Wenn jedoch TT, CT, gesunde und

erkrankte CC separat analysiert wurden, zeigte sich eine signifikante Korrelation nur für die Heterozygoten ($r^2=0.7$, $p<0.05$). Es gab keine Korrelation zwischen dem Alter in der Gesamtpopulation für Männer und Frauen mit der AMP-Deaminase, der cN-I oder der ecto-5'-Nukleotidaseaktivität (Abbildung 11). Es war auch keine Korrelation nachzuweisen zwischen der AMP Deaminaseaktivität und den Aktivitäten für die Gesamt cN und die ecto-5'-Nukleotidase (Tabelle 4).

Zwischen der Zusammensetzung der Muskelfaser gemessen am Prozentualen Anteil der oxidativen Typ-I-Fasern und den einzelnen *AMPD1* Genotypen wurde kein Zusammenhang gefunden (Tabelle 4). Es gab auch keine signifikante Korrelation zwischen der Zusammensetzung der Muskelfasern und der cN-I Aktivität (Abbildung 12) oder der AMP Deaminaseaktivität bei CC, CT und TT (Daten nicht gezeigt). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in den Aktivitäten der AMP Deaminase, der cN-I, der Gesamt cN, der ectoN und der 5'-Nukleotidase im Gesamthomogenat zwischen Männern und Frauen finden. (Tabelle 4).

Abbildung 10. Schwache inverse Korrelation zwischen AMP Deaminase und zytosolischer AMP-5'-Nukleotidaseaktivität im menschlichen Skelettmuskel. *TT* (n=6, weiße Dreiecke), *CT* (n=7, schwarze Dreiecke), gesunde *CC* (n=11, weiße Kreise), erkrankte *CC* (n=17, schwarze Kreise). Gesamt *CC*: $r^2=0.18$; $p=0.01$; power, 0.8.

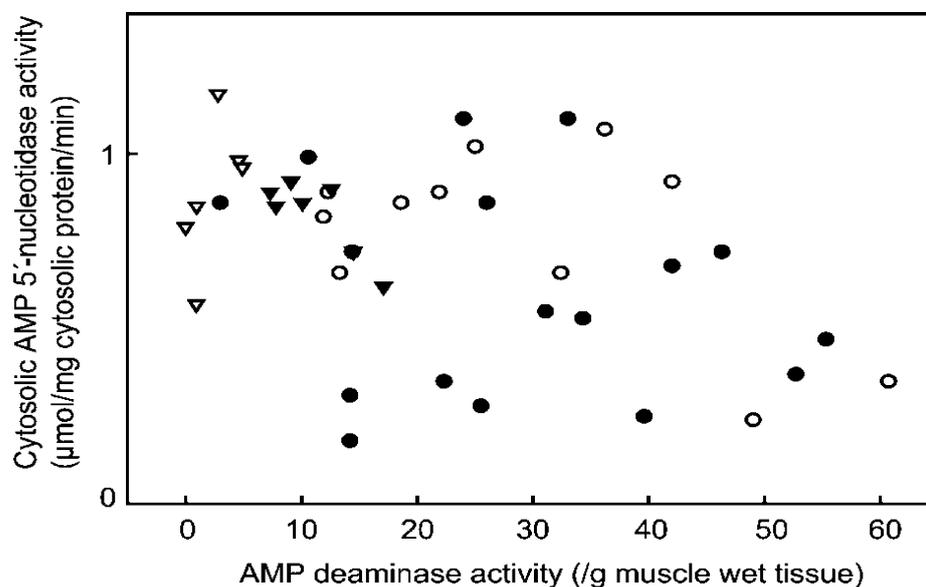


Table 4. Alter, Geschlecht, Aktivitäten der AMP Deaminase, der cN-I, der total cN, und der ectoN sowie der Prozentsatz der oxidativen, Typ-1-Fasern bei Patienten mit unterschiedlichen c.34C>T Genotypen und Kontrollen mit normalen oder pathologischen Biopsiefunden. Values are presented as mean"SD (range).

Parameter	CC Normal controls	CC Diseased controls	CT	TT
Number	12	16	7	6
Männer/Frauern	10/2	9/7	3/4	3/3
Alter (Jahre)	47.1"13.9 (23–69)	41.3"15.1 (18–64)	34.2"14.6 (14–60)	47.5"12.9 (30–62)
cN-I Aktivität (mmol/mg cytosolic protein/min)	0.84"0.25 (0.53–1.43)	0.95"0.25 (0.55–1.45)	0.82"0.11 (0.62–0.92)	0.89"0.20 (0.57–1.17)
Männer	0.85"0.27 (0.53–1.43)	0.89"0.24 (0.65–1.43)	0.79"0.14 (0.62–0.85)	0.98"0.19 (0.79–1.17)
Frauen	0.66 and 0.86	1.02"0.27 (0.55–1.45)	0.85"0.09 (0.72–0.92)	0.79"0.20 (0.57–0.96)
Gsamt cN Aktivität (mmol/mg homogenate protein/min)	0.26"0.06 (0.18–0.35)	0.35"0.10 (0.21–0.56)	0.33"0.11 (0.20–0.48)	0.43"0.36 (–0.06–0.95)
Männer	0.27"0.06 (0.18–0.35)	0.31"0.09 (0.21–0.47)	0.30"0.14 (0.20–0.46)	0.41"0.21 (0.24–0.65)
Frauen	0.18 and 0.28	0.39"0.10 (0.28–0.56)	0.35"0.11 (0.24–0.48)	0.26"0.07 (0.18–0.32)
ectoN Aktivität mmol/mg homogenate protein/min)	0.31"0.24 (0.02–0.70)	0.57"0.30 (0.04–1.17)	0.52"0.36 (0.04–0.95)	0.43"0.37 (–0.06–0.95)
Männer	0.27"0.23 (0.02–0.70)	0.45"0.29 (0.04–1.03)	0.53"0.46 (0.04–0.95)	0.68"0.23 (0.52–0.95)
Frauen	0.41 and 0.64	0.72"0.24 (0.45–1.17)	0.51"0.34 (0.29–0.84)	0.18"0.30 (0.06–0.52)
AMP deaminase activity (U/g muscle wet tissue)	28.8"14.4 (11.9–60.7)	28.9"16.6 (0.0–55.3)	10.4"5.2 (0.0–17.1)	2.4"2.1 (0.0–4.9)
Männer	31.4"14.4 (11.9–60.7)	30.4"18.8 (0.0–55.3)	9.4"6.8 (0.0–17.1)	2.5"2.3 (0.0–4.6)
Frauen	16.6"3.7 (13.3–18.6)	27.0"14.6 (10.6–52.7)	11.6"2.4 (9.1–16.5)	2.3"2.3 (0.9–4.9)
Type 1 fibre (%)	38.2"9.3 (27.0–55.4)	40.7"18.0 (20–70)	44.6"16.9 (12.3–66.2)	50.4"20.5 (21.1–75.0)

Außerdem wurde mittels multipler linearer Regressionsanalyse kein Zusammenhang zwischen den abhängigen Variablen der Aktivitäten der cN-I, der Gesamt cN, der ectoN oder der 5'-Nukleotidase im Gesamthomogenat und den unabhängigen Variablen Alter, Fasertyp und AMPD1 Genotyp gefunden (Abbildung 12). Die Western Blot Analyse mit dem cN-I Antikörper (der freundlicherweise von Dr. Sally Hunsucker, University of North Carolina, USA, zur Verfügung gestellt wurde) zeigt keinen Unterschied in der Immunoreaktivität der cN-I Bande bei 40 kDa bei jeweils zwei TT und CC (Abbildung 13).

Abbildung 11. Fehlende Korrelation zwischen Alter und zytosolischer AMP-5'-Nukleotidase im menschlichen Skelettmuskel. *TT* (n=6, schwarzer Kreis); *CT* (n=7, weißer Kreis), *CC* (n=28, schwarzes Dreieck). $r^2=0.02$; $p=0.4$; Power, 0.13.

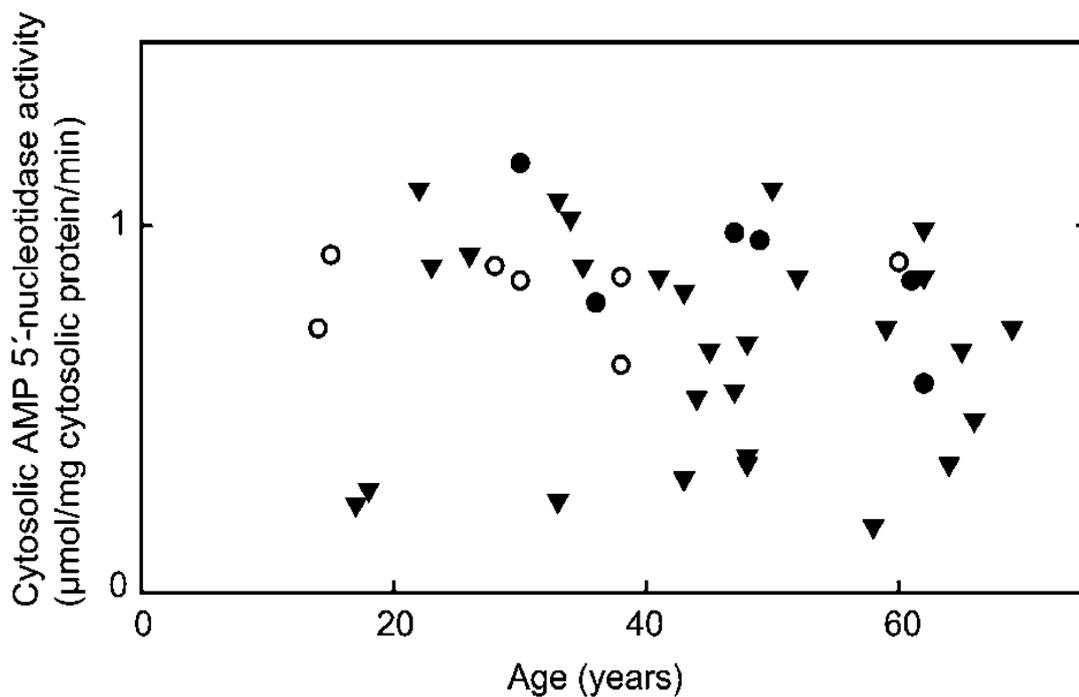


Abbildung 12. Fehlende Korrelation zwischen oxidativen Typ-I-Fasern und zytosolischer AMP-5'-Nucleotidase im menschlichen Skelettmuskel. *TT* (n=4, schwarzer Kreis); *CT* (n=5, weißer Kreis), *CC* (n=25, schwarzes Dreieck). $r^2=0.09$; $p=0.08$; Power, 0.42.

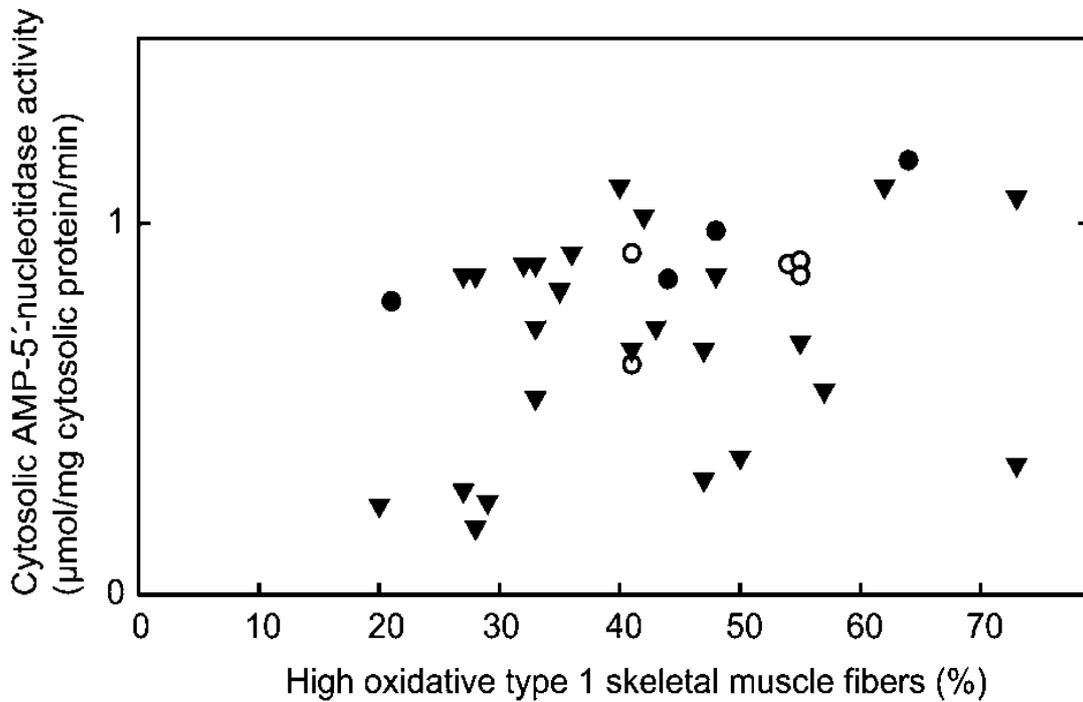
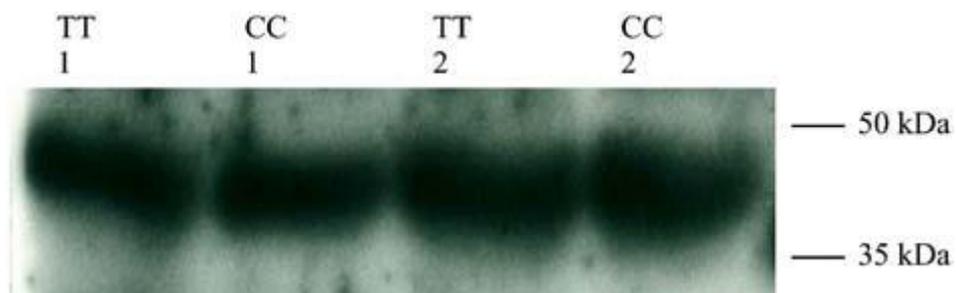


Abbildung 13. Western blot Analyse mit anti-cN-I Antikörper zeigt gleichstarke Bande bei 40 kDa bei 2 TT und 2 CC.



4.3. Ergebnisse im standardisierter Handkrafttest

In vorherigen Studien mit dem Handkraftmessgerät konnte gezeigt werden, dass im herkömmlichen ischämischen Handkrafttest (IEFT) bei 80% der individuellen maximalen Kontraktionskraft (MCF) bei gesunden Kontrollen der Laktatanstieg (Δ Laktat) 11.4% und die spezifische Laktatproduktion 17.4% niedriger liegt als im Handkrafttest unter nichtischämischen Bedingungen, d. h. die effizientere Testform darstellte. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass es weder im ischämischen noch im nichtischämischen Handkrafttest sowohl bei den gesunden Kontrollen (relativ homogener Altersbereich) als auch bei dem altersmäßig heterogenen Kollektiv von Patienten mit diversen Myopathien eine Korrelation weder zwischen dem absoluten, noch dem spezifischen Laktatanstieg und der Arbeit gefunden werden konnte (Hanisch et al. 2006b).

Die standardisierte Handkrafttestung hatte sich auch bewährt, um einen neuartigen Test zum klinischen Screening von Patienten mit Mitochondriopathie zu etablieren (Hanisch et al. 2006a). Es wurde nach einer pathologischen Sauerstoffentsättigung (Δ sO₂) bei einer standardierten dreiminütigen Testung bei 30% der MCF gesucht, die eine Spezifität von 96% bei einer allerdings nur geringen Sensitivität von 42% zur Erkennung von Mitochondrienstörungen aufwies.

Es gab keine Unterschiede in der maximalen Kontraktionskraft und in der Arbeitsleistung zwischen CC, CT und TT. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in dem NH_3 -Quotienten_{Spitzenwert/Ruhewert} und dem NH_3 -Quotienten/Laktat-Quotienten zwischen CT und CC gefunden. Beide Parameter waren signifikant niedriger in TT als in CT und CC. Es bestand jedoch kein Unterschied im Ruhelaktat, Spitzenlaktat, dem Laktat-Quotienten_{Spitzenwert/Ruhewert} und der spezifischen Laktatproduktion bei standardisierter Handkraftmessung zwischen den drei Gruppen (Tabelle 5).

Wurden die CT Individuen nach klinischen Gesichtspunkten stratifiziert in Gesunde, Patienten mit Myalgien und Belastungsintoleranz sowie definierten Myopathien, zeigte sich, dass die Gesunden am jüngsten und kräftigsten waren und damit auch den höchsten Laktat- und NH_3 -Anstieg aufwiesen. Wurden die

Werte jedoch normalisiert und der NH₃-Quotienten/ Laktat-Quotienten gebildet, verschwanden die Unterschiede zwischen den drei klinischen Gruppen (Tabelle 6).

Tabelle 5. Ergebnis des standardisierten ischämischen Handkrafttestes geordnet nach dem c.34C>T Genotyp. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (Range) aufgeführt.

	TT	CT	CC	One-Way ANOVA
n	6	15	8	
Geschlecht (männlich/weiblich)	2/4	5/10	4/4	
Alter (Jahre)	41 \pm 14 (21-62)	43 \pm 13 (19-65)	40 \pm 6 (32-50)	n.s.
AMP Deaminaseaktivität [U/g Protein]	2.1 \pm 1.8 (0.04-4.6)	14.9 \pm 4.6 (10-24)	40.9 \pm 19.8 (14-80)	p<0.01
MCV ¹ [N]	320 \pm 151 (118-561)	312 \pm 129 (109-577)	431 \pm 134 (269-642)	n.s.
Arbeit [kN x s]	5.2 \pm 2.3 (2.2-8.5)	5.8 \pm 2.3 (1.2-9.6)	7.0 \pm 2.5 (3.2-10.6)	n.s.
Laktatquotient _{Maximal/Ruhe}	3.3 \pm 1.4 (1.7-5.7)	4.1 \pm 1.6 (1.5-6.8)	4.6 \pm 1.7 (2.7-7.4)	n.s.
NH ₃ Quotient _{Maximal/Ruhe}	1.1 \pm 0.2 (0.8-1.3)	3.5 \pm 2.1 (1.8-8.3)	4.1 \pm 1.4 (2.1-5.6)	p<0.01
Laktatquotient/NH ₃ Quotient	3.32 \pm 1.30 (1.30-5.50)	1.90 \pm 0.72 (1.30-2.50)	1.04 \pm 0.54 (1.49-2.20)	p<0.01
Spezifische Laktatproduktion [mmol x s / L x kN]	0.61 \pm 0.32 (0.39-1.20)	0.67 \pm 0.34 (0.20-1.70)	0.63 \pm 0.26 (0.39-1.08)	n.s.
Spezifische NH ₃ -Produktion [mmol x s / L x kN]	0.21 \pm 0.10 (0.11-0.39)	0.60 \pm 0.29 (0.21-1.90)	0.56 \pm 0.26 (0.26-1.8)	p<0.01

¹ MCV maximal contraction force (maximale Kontraktionskraft)

Tabelle 6. Ergebnis des standardisierten ischämischen Handkrafttestes bei gesunden CT, CT mit belastungsabhängigen Beschwerden und CT mit einer definierten Muskelerkrankung. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (Range) angegeben.

	CT		
	Gesund	Myalgie & Belastungsintoleranz	Myopathie
Anzahl (n)	6	3	6
Alter (Jahre) ¹	33 \pm 14 (19-52)	42 \pm 5 (31-47)	53 \pm 7 (46-65)
MCV (N) ²	402 \pm 125 (272-577)	237 \pm 56 (186-292)	263 \pm 117 (109-426)
Arbeit (kN x s) ²	6.9 \pm 2.1 (5.2-9.7)	4.9 \pm 0.1 (4.7-5.0)	4.7 \pm 2.0 (1.3-6.5)
Lactate- ² Quotienten _{Spitzenwert/Ruhewert}	5.1 \pm 0.9 (3.7-6.1)	4.2 \pm 0.3 (3.9-4.5)	3.4 \pm 1.8 (1.4-6.4)
NH ₃ - ² Quotienten _{Spitzenwert/Ruhewert}	3.0 \pm 1.7 (1.7-6.1)	2.4 \pm 1.4 (1.5-4.0)	2.1 \pm 1.6 (1.2-5.4)
NH ₃ -Quotient/ ² Laktat-Quotient	0.6 \pm 0.3 (0.3-1.1)	0.6 \pm 0.3 (0.3-0.9)	0.6 \pm 0.2 (0.4-0.9)

¹ – One-Way ANOVA (p<0.05), ² – One-Way ANOVA p n.s.

5. DISKUSSION

5.1 Die Häufigkeit eines mutierten *AMPD1* Allels in verschiedenen Populationen

Die vorliegende Arbeit zeigte keinen Unterschied in der Häufigkeit der mutierten c.34C>T Allele, d. h. für CC, CT und TT, bei gesunden Blutspendern, Patienten mit isolierten Myalgien und belastungsabhängigen Beschwerden sowie Patienten mit definierten neuromuskulären Erkrankungen. Dieser Befund stimmt mit den berichteten Häufigkeiten von TT und CT in anderen Populationen mit gesunden Personen und Patienten mit Muskelbeschwerden überein (Tabelle 5) (Verzijl et al. 1998, Rubio et al. 2000, 2005, Norman et al. 1998, Morisaki et al. 1992, Gross et al. 1992, Rico-Sanz et al. 2003, Fischer et al. 2005, Martinuzzi et al. 2002).

5.2. Der klinische Phänotyp bei homozygoter c.34C>T Mutation

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Kohorte der Patienten, die sich einer Muskelbiopsie unterzogen hatten, und die nach dem Vorliegen der c.34C>T Mutation in CC, CT und TT stratifiziert wurden, keinen Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit klinischer Symptome, histopathologischer, elektrophysiologischer und laborchemischer (damit ist der Serumspiegel der Creatinkinase gemeint) Befunde. Es ließ sich insbesondere kein Unterschied in der Häufigkeit von Myalgien und belastungsabhängigen Beschwerden zwischen TT und CC finden. Auch wenn die Patienten mit Myalgien und belastungsabhängigen Beschwerden nach dem Vorliegen der c.34C>T Mutation in CC, CT und TT stratifiziert wurden, ließ sich kein Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit klinischer Symptome, histopathologischer, elektrophysiologischer und laborchemischer Befunde finden. Das heißt, das Vorliegen einer homozygoten c.34C>T Mutation (TT) ließ sich keinem spezifischen bzw. abgrenzbaren Phänotyp zuordnen. Das entspricht dem bisherigen Kenntnisstand.

Eine erworbene oder sekundäre Form der AMP-Deaminasedefizienz mit biochemisch nachweisbaren erniedrigten Enzymaktivitäten der AMP-Deaminase in Patienten mit einer zugrunde liegenden neuromuskulären

Erkrankung wurde von Fishbein vorgeschlagen (Fishbein 1986, Sabina et al. 1992). In der vorliegenden Untersuchung wurden jedoch keine Unterschiede in den AMP-Deaminaseaktivitäten zwischen Patienten mit einer definierten neuromuskulären Erkrankung und Patienten mit ausschließlich belastungsabhängigen Beschwerden gefunden. Wenngleich die Streubreite der gemessenen AMP Deaminaseaktivitäten sehr weit gestreut war, was zu einer breiten Überlappung der AMP-Deaminaseaktivitäten bei CC und CT führte, fiel jedoch keine dieser Aktivitäten in den Bereich der TT.

Es kann anhand unserer Daten in Zusammenschau mit geschlussfolgert werden, dass der TT Genotyp nicht mit einem höheren Auftreten von belastungsabhängigen Beschwerden und Myalgien oder einem anderen abgrenzbaren Phänotyp assoziiert ist. Es gibt keinen biochemischen Anhalt dafür, dass eine sekundäre AMP-Deaminasedefizienz im Gefolge einer anderen neuromuskulären Erkrankung auftritt.

5.3 Die Restaktivität bei homozygoten für die c.34C>T Mutation

Die AMP-Deaminaserestaktivitäten in TT könnten erklärt werden mit den Aktivitäten der anderen beiden AMP-Deaminaseisoformen, die auf anderen Genen kodiert sind (*AMPD2* für die Leber-Isoform; *AMPD3* für die Erythrozyten-Isoform). Es wurde gezeigt, dass die Erythrozytenisoform zu 18-76% zu der Restaktivität an AMP-Deaminase bei AMP-Deaminasedefizienten Individuen (TT) beiträgt (Van Kuppelvelt et al. 1994). Eine kompensatorische Erhöhung der *AMPD2* oder *AMPD3* Genexpression wurde jedoch in *AMPD*-Deaminase defizienten Individuen bisher nicht gemessen (Mahnke-Zizelman et al. 1992).

Als weiterer Mechanismus, der die Restaktivität erklären oder beeinflussen könnte, käme ein alternatives Spleißen in Betracht, von dem gezeigt wurde, dass es in 0.6-2% der *AMPD1* mRNA Transkripte im adulten humanen Skelettmuskel vorkommt (Morisaki et al. 1993). In keinem der TT Fälle aus unserer Kohorte, ließ sich jedoch biochemisch oder histochemisch ein Kompensationsmechanismus nachweisen, der mit einer relevanten Erhöhung der AMP-Deaminaseaktivität einherging. D. h. mit anderen Worten, alle TT

Individuen unserer Kohorte hatten die zu erwartenden extrem niedrigen AMP-Deaminaseaktivitäten.

Das Fehlen von Symptomen in vielen TT Individuen könnte durch alternative Abbauege erklärt werden, die die Akkumulation von AMP unter den Bedingungen körperlicher Belastung verhindern. Im folgenden Kapitel wird zur Hypothese Stellung genommen, dass im Skelettmuskel von Personen mit TT der Abbau des intrazellulären AMP zu Adenosin durch die zytosolische AMP-5'-Nukleotidase erfolgen kann (Norman et al. 2001). Allerdings konnten wir weder eine verstärkte Bindungskapazität für AMP durch die zytosolische AMP 5'-Nukleotidase, noch eine erhöhte Expression dieses Enzyms in Personen mit einem homozygoten AMP-Deaminasemangel nachweisen (Hanisch et al. 2006). Es kann eher vermutet werden, dass die höhere Verfügbarkeit des AMP Substrates in AMP Deaminase defizienten Personen zu einem erhöhten Umsatz des AMP durch die zytosolische AMP 5'-Nukleotidase führt. Ob dieser Mechanismus ausreichend ist, die fehlenden Symptome in gesunden AMP-Deaminase defizienten Personen zu erklären, muss offen bleiben.

5.4 Andere *AMPD1* Genotypen

Bei Patienten, die heterozygot für die c.34T>C Mutation (CT) sind, könnte eine weitere heterozygote Mutation auf dem anderen Allel, wie z. B. die c.1162C>T und c.1274G>A (Morisaki et al. 2000), die c.860A>T und c.930G>T (Toyama et al. 2004) und IVS2-(4-7)delCTTT I (Isackson et al. 2005) zu einer weiteren Reduktion der AMP-Deaminaseaktivität führen. Compound Heterozygote für c.34C>T und c.468G>T weisen AMP-Deaminaseaktivitäten auf, die denen entsprechen, wie sie bei homozygoter c.34C>T (TT) gefunden werden (Gross et al. 2002). Rekombinante Proteine mit der c.860A>T Mutation wiesen eine AMP-Deaminaseaktivität auf, die nur einem Drittel oder der Hälfte der Aktivität des rekombinanten *AMPD1* Wildtypes entspricht und einen erhöhten K_m Wert für das Substrat AMP aufweisen (Isackson et al. 2005). In einer deutschen Studie wurde bei jedem dritten CT Patienten eine Compound Heterozygotie mit der c.468G>T gefunden (Gross et al. 2002). Im Gegensatz zu anderen CT hatten diese Compound Heterozygoten eine fehlende histochemische AMP-Deaminasedarstellung. Diese Arbeit und eine frühere Studie (Fischer et al.

2005) deuten jedoch darauf hin, dass diese Kombination der Kompound-Heterozygotie in unselektionierten CT Kohorten sehr selten ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die c.860A>T Mutation mit einer Allelfrequenz von 0.8-2.8% gefunden, die den Allelfrequenzen in anderen Arbeiten von 2.5-6.5% in gesunden Kontrollen und Patienten mit Myopathie entspricht (Toyama et al. 2004).

99 Patienten mit der homozygoten R50X Mutation im *PYGM* Gen und dem klinischen Phänotyp einer McArdle Erkrankung wurden hinsichtlich ihres Genotypes (*ACE* (I/D), *AMPD1* (p.Q12X), *PRARGC1A* (p.G482S), *ACTN3* (p.R577X)) stratifiziert. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der McArdle Erkrankung und den anderen Genotypen gefunden werden (Rubio et al. 2007, Rubio 2008).

Tabelle 7. Häufigkeit der c.34C>T Mutation bei Kaukasiern

Population	Ethnische Zuordnung	Anzahl	TT (%)	CT (%)	Literaturangabe
Gesunde Kontrollens	Niederländisch	100	2	18	Verzijl et al. 1998
	Spanisch	100	0	17	Rubio et al. 2000
	Deutsch	107	2.5	25.6	Hanisch et al. 2008
Top-level endurance athlets	Spanisch	104	0	8.7	Rubio et al. 2005
Randomly selected individuals	Swedisch	175	1.7	24	Norman et al. 1998
	Europ. americans	59	3,3	17	Morisaki et al. 1992
	Deutsch	106	2.8	19	Gross et al. 1992
HERITAGE Familienstudie Individuen ohne muskuläre Beschwerden	Europ. americans	503	1.2	19.3	Rico-Sanz et al. 2003
	Deutsch	290	1.4	17	Gross et al. 1995
Individuen mit muskulären Beschwerden	Deutsch	320	1.9	25	Gross et al. 1995
	Spanisch	50	0	18	Rubio et al. 2000
Patienten mit Muskelbiopsie wegen Neuromuskulärer Beschwerden	Niederländisch	2388	1.4	n.d.	Verzijl et al. 1998
	Deutsch	1673	1.8	n.d.	Fischer et al. 2005
	Deutsch	174	3.4	21.8	Hanisch et al.2008
	Spanisch	400	1.5	n.d.	Rubio et al. 2000
Verdacht auf metabolische Myopathie Patienten mit McArdle Glykogenose	Deutsch	200	4.5	16.3	Hanisch et al.2008
	Italienisch	43	2.1	11.7	Martinuzzi et al.2002

Tabelle 8. Häufigkeit der c.34C>T Mutation bei Hochleistungssportlern

Population	Anzahl [n]	TT [%]	CT [%]	CC [%]	Literaturangaben
<u>Griechisch</u>					
Langstreckenläufer	438	0.9	21.2	76.7	Tsianos et al. 2009
<u>Polnisch</u>					
Ruderer	127	0.0	19.0	88.2	Cięszczyk et al. 2011
Kontrollen	251	1.6	23.1	75.3	Cięszczyk et al. 2011
<u>Spanisch</u>					
Fußballprofispieler	54	0	20	80	Juffer et al. 2009
Ruderer	39	2.6	21.1	76.3	Muniesa et al. 2010, Santiago et al. 2010
Radrennfahrer	50	0.0	12	88	Rubio et al. 2005
Langstreckenläufer	52	0.0	5.8	94.2	Rubio et a. 2005, Lucia et al. 2006
Kontrollen	123	0.8	17.1	82.1	Rubio et al. 2005, Muniesa et al. 2010

5.5 Die Auswirkungen hochintensiver Belastung in Abhängigkeit vom *AMPD1* Genotyp bei Gesunden

5.5.1 Parameter für hochintensive, kurzzeitige Belastung in Abhängigkeit vom *AMPD1* Genotyp bei gesunden Probanden

In einer Studie mit kleiner Fallzahl, in der die Ausdauer älterer CC und CT Frauen (jedoch keine TT) untersucht wurde, fanden sich keine Unterschiede in Parametern wie der maximalen O₂-Aufnahme, der erreichten Maximalkraft und Leistung oder der submaximalen Ausdauerperformance (Perez et al. 2006). In einem Fahrradbelastungstest an gesunden, körperlich aktiven, alters-, fitness und geschlechtsgematchten Probanden ergaben sich in allen *AMPD1* Genotypen vergleichbare Spitzenwerte. Es zeigte sich jedoch ein rascherer Abfall der Kraft bei den Homozygoten und Compound Heterozygoten, resultierend in einer ca. 10 % geringerer Durchschnittskraft bzw. Leistung (Fischer et al. 2007). Im Rahmen der HERITAGE Studie wurden ebenfalls statistisch signifikant im Rahmen von Belastungstests geringere Maximalwerte für den Poweroutput und den Vo₂ und Vco₂ für Homozygote (TT) gemessen (Rico-Sanz et al. 2003). Zumindest deuteten diese Untersuchungen darauf hin, dass zumindest im Bereich hochintensiver Belastungen oder sogar des Leistungssports (wenn schon nicht im Alltag) Individuen mit TT benachteiligt und weniger leistungsfähig sein könnten.

In Muskelbiopsien vor und nach Laktatämietest in fünf AMP Deaminasedefizienten und 10 Kontrollen, bei denen kein Unterschied in der Belastbarkeit festgestellt wurde, konnte in beiden Gruppen eine hohe Adenylatenergiebelastung aufrechterhalten werden, die auf eine normale Regulation zwischen ATP Verbrauch und Bildung hindeutete. ATP, ADP und Gesamtadeninnukleotide waren in AMP defizienten Muskelproben signifikant erhöht, aber nicht die AMP (Sinkeler et al. 1987).

5.5.2 NH₃ als Effektor der Glykolyse *in-vivo*

Falls NH₃ als Effektor der Glykolyse *in-vivo* agiert, sollte die Laktatbildung bei kurzzeitiger und hochintensiver Belastung, wie es im standardisierten ischämischen Handkrafttest simuliert wird, bei Patienten mit AMP-Deaminasedefizienz niedriger sein als beim Wildtyp. In der vorliegenden Studie zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der Laktatbildung bezogen auf die Arbeit bei kurzzeitiger, hochintensiver Belastung bei CC, CT und TT. Die Ergebnisse dieser Studie stimmen mit früheren Studien überein, die keine unterschiedliche Laktatakkumulation bei verschiedenen Belastungsprotokollen bei CC und TT finden konnten (Tarnopolsky et al. 2003, Norman et al. 2001). In diesen Studien war jedoch die Laktatproduktion nicht auf die Arbeit bezogen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Ammoniakproduktion bezogen auf die Arbeit und auf die Laktatproduktion bei gesunden Heterozygoten sich nicht von der Ammoniakproduktion bei Patienten mit gesicherter Myopathie unterscheidet. Dies spricht zusätzlich gegen die von Fishbein 1986 historisch geäußerte Vermutung eines Double Trouble.

Zusammenfassend scheint ein AMP-Deaminasemangel weder den Citratzyklus (Anaplerotische Funktion), noch die Glykolyse durch allosterische Aktivierung der Phosphofruktokinase infolge NH₃ Erhöhung *in-vivo* bei kurzzeitiger und hochintensiver Belastung zu beeinflussen.

5.5.3 Der AMPD1 Genotyp als Prädiktor zur Eignung für den Hochleistungssport

In einer Population aus männlichen Weltklasse Ausdauersportlern (Radrennfahrer, Läufer, n=104) fand sich kein Unterschied in Leistungsparametern (z. B. der maximalen Sauerstoffaufnahme) zwischen Trägern des mutierten T Allels und dem Wildtyp. Die Häufigkeit des mutierten T Allels war in bei den Leistungssportlern etwas geringer als bei 100 zufällig ausgewählten gesunden (d. h. asymptomatischen) Kontrollen (Rubio et al. 2005, Lucia et al. 2006).

In der Tabelle 7 sind die Häufigkeiten des Vorkommens der c.34C>T Mutation im Heterozygoten- und Homozygotenstatus in einer spanischen Population bei Fußballprofis, Ruderern, Radrennfahrern, Langstreckenläufern im Vergleich zu Kontrollen aufgeführt. Bei den Sportlerkohorten handelt es sich ausschließlich um internationale und nationale Spitzensportler. Außerdem ist die Häufigkeit der c.34C>T Mutation bei griechischen Langstreckenläufern aufgeführt, die den Olymp-Berg hinaufrennen (Muniesa et al. 2010, Ruiz et al. 2009, Juffer et al. 2009, Tsianos et al. 2009).

Die Häufigkeiten entsprechen denen der in anderen in der Tabelle 6 aufgeführten Populationen.

5.5.4 Der *AMPD1* Genotyp im Rahmen eines polygenetischen Profils, das zu Belastungsintoleranz führt

Man hat versucht, ein polygenetisches Profil zu finden, das beeinflusst, ob ein Mensch sich zu einem Spitzenathleten qualifiziert oder eine größere Neigung zu belastungsabhängigen Beschwerden aufweist.

Polymorphismen aus folgenden Genen wurden analysiert: *ACTN3*, *ACE*, *PPARGC1A*, *AMPD1*, *CKMM*, *GDF8*, *HFE*, *ADRB2*, *APOE*. Ein Zusammenhang wurde lediglich für einen *ACE* Polymorphismus gefunden, nicht jedoch für die Mutation c.34C>T im *AMPD1* Gen (Muniesa et al. 2010, Gonzalez-Freire et al 2009, Santiago et al. 2010). Dabei wurden Spitzensportler verschiedenen Disziplinen mit der Normalbevölkerung verglichen. Es wurde auch kein Zusammenhang des untersuchten genetischen Profils zur Anzahl und Art der Medaillen bei nationalen und internationalen Meisterschaften gefunden (Santiago et al 2010).

In einer amerikanischen Studie an 3783 Teilnehmern der „Coronary Artery Risk Develoepement in Young Adults“ – Studie wurden 217 verschiedene Single Nucleotid Polymorphismen untersucht, die einen Zusammenhang zu belastungsinduzierten Beschwerden haben könnten. Im Beobachtungszeitraum von 20 Jahren scheinen Polymorphismen/Mutationen in folgenden Genen *ATG*, *AMPD1*, *ANG* und *PRARGC1A* bei der weißen, nicht jedoch der

afroamerikanischen Subgruppe, mit einer verringerten Belastungsdauer assoziiert zu sein (Sarzynski et al. 2010).

5.6 Der Einfluss der zytosolischen 5'-Nukleotidasen auf den AMP-Abbau

Der Abbau von AMP im Skelettmuskel erfolgt durch die Skelettmuskel-Isoform der AMP-Deaminase, alternativ besteht jedoch noch die Möglichkeit des Abbaus über die zytosolischen 5'-Nukleotidasen.

5.6.1 Der intramuskuläre Adenosinspiegel nach kurzzeitiger, hochintensiver Belastung

Im Skelettmuskel der Ratte ist die Affinität der AMP-Deaminase für AMP 50-fach höher (K_m ca. 0.05 mM) als die der zytosolischen 5'-Nukleotidase (K_m 1.7-2.8 mM) (Rudell et al. 1992, Tullson und Terjung 1999, Cheng et al. 2000). Deshalb erscheint ein funktionell relevanter Abbau von AMP zu Adenosin in Skelettmuskelzellen mit normaler AMP-Deaminaseaktivität unwahrscheinlich. Bei Individuen mit unterschiedlichem AMPD1 Genotyp (CC, CT, TT) wurden unter Ruhebedingungen im Serum und im Skelettmuskel keine signifikant unterschiedlichen Adenosinspiegel gemessen (Tarnopolsky et al. 2001, Andreassi et al. 2005). Wenngleich wir in unserer Studie an humanem Skelettmuskel einen zehnfach niedrigeren K_m Wert im Vergleich zu den publizierten K_m Werten aus dem Skelettmuskel der Ratte fanden, scheint der Abbau von AMP zu IMP durch die AMP-Deaminase auch im menschlichen Muskel der vorherrschende Abbauweg zu sein. Dies wird durch den Befund bestätigt, dass eine deutliche Akkumulation des Abbauproduktes IMP ohne messbare Akkumulation von AMP in humanen Skelettmuskelbiopsien, die nach einer kurzzeitigen, hochintensiven Belastung entnommen wurden, auftritt (Hellsten et al. 1999a). In zwei vorherigen Studien wurden Purinnukleotide in humanen Skelettmuskelbiopsien vor und nach Belastungen in Individuen mit den Genotypen CC, CT und TT gemessen (Norman et al. 2001, Tarnopolsky et al. 2001). In beiden Studien wurde erhebliche Anstiege nach Belastung für IMP in CC und CT Individuen gefunden, jedoch keine oder nur sehr geringe Anstiege in TT Individuen. Die AMP Spiegel blieben in den CC und CT Individuen vor und nach Belastung fast auf dem gleichen Niveau, während sie bei den TT Individuen um das 6.3-fache nach Belastung anstiegen

(Tarnopolsky et al. 2001). In der anderen Studie wurde jedoch solch ein Anstieg nach Belastung bei TT Individuen nicht beobachtet (Norman et al. 2001) Die TT Individuen wiesen jedoch auch in dieser Studie vor und nach kurzzeitiger und hochintensiver Belastung einen Trend zu höheren AMP Spiegeln im Vergleich zu CC und CT Individuen auf. In beiden Studien blieben bei den CC und CT Individuen die Adenosinwerte nach Belastung unverändert. Norman et al. (2001) konnte einen erheblichen Anstieg von Adenosin bei TT Individuen feststellen. Tarnopolky et al. (2001) fanden jedoch nur einen Anstieg des Adenosins bei TT Individuen um das 1.2-fache. Die Unterschiede in diesen Studien dürften auf eine verzögerte Probengewinnung zurückzuführen sein. Die Adenylatkinase erzeugt nach Belastung im wieder ruhenden Muskel sehr schnell ein Gleichgewicht im Adenosinnukleotidpool. Wenn dies erreicht wird, bevor die Muskelproben nach Belastung gewonnen und in flüssigen Stickstoff überführt werden, werden Veränderungen in AMP und seinen Metaboliten nicht adäquat erfasst abgebildet. Trotz der schienbar begrenzten Bildung von Adenosin in Skelettmuskelfasern im Vergleich zu Endothelzellen scheint Skelettmuskel jedoch auch eine wichtige Quelle des extrazellulären Adenosin zu sein, das durch die Ekto-Nukleotidasen produziert wird (Lyngne et al. 2001). Es wurde berichtet, dass die Adenosinkonzentration im Interstitium des humanen Skelettmuskels während Muskelkontraktion ansteigt. Der Adenosinspiegel korrelierte mit dem Anstieg der Blutflusses im Skelettmuskel, so dass Adenosin eine Rolle in der Regulation des Blutflusses am arbeitenden Muskel zugeschrieben wurde (Hellsten et al. 1998). Es wurde eine stärkere vasodilatative Antwort auf eine Unterarmischämie bei weiblichen Probanden mit CT im Vergleich zu weiblichen Probanden mit CC gemessen (Hand et al. 2006, Riksen et al. 2007), allerdings wurden keine TT gemessen. Basierend auf der Adenosinhypothese wurde der Blutfluss der Femoralarterie bei hochintensiver Fahrradbelastung bei gesunden und nach AMPD1 Genotyp stratifizierten Probanden gemessen (Norman et al. 2008). Dabei zeigten sich unter und nach Belastung höhere Spitzenflüsse in der A. femoralis bei Homozygoten (TT), aber auch Heterozygoten (CT) im Vergleich zum Wildtyp. Dieser rein fokale, in seiner Wirkung auf die arbeitende Skelettmuskulatur bezogenen Effekt, könnte ein Indiz für eine kompensatorische Wirkung bei hochgradigem AMP-Deaminasemangel darstellen, allerdings sollte er nicht bei Heterozygoten zu erwarten gewesen sein.

Die technischen Grenzen in der Abbildung von Veränderungen im Nukleotidpool, die durch die Methode der Muskelbiopsie gegeben sind, können durch die Methode der ^{31}P -Magnetresonanzspektroskopie gelöst werden, die eine höhere zeitliche Auflösung und ein „online“ Monitoring bei Individuen erlaubt. Im Gegensatz zu den vorliegenden biochemischen Studien zeigte sich bei gesunden Individuen in der ^{31}P -Magnetresonanzspektroskopie eine Akkumulation von ADP und AMP nach kurzzeitiger, hochintensiver Belastung unter ischämischen Bedingungen (Crowther et al. 2002). ^{31}P -Magnetresonanzspektroskopie-Daten, die Veränderungen nach Belastungen bei TT Individuen untersuchen, liegen bis jetzt nicht vor.

5.6.2 Expression oder Kinetik der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase bei AMP-Deaminasemangel

Es war unsere Arbeitshypothese, dass die Clearance von AMP durch die zytosolische AMP 5'-Nukleotidase als kompensatorischer Abbauweg bei AMP-Deaminasemangel, d. h. bei TT Individuen, eine Rolle spielt. Diese Ansicht wurde auch durch die Ergebnisse der Studie von Norman et al. (2001) gestützt. Eine höhere kompetitive Fähigkeit der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase für das Substrat AMP könnte einerseits erreicht werden durch Veränderungen in der relativen Proteinexpression oder durch Veränderungen im katalytischen Verhalten dieses Enzyms in Individuen mit einer hochgradig verminderten AMP-Deaminaseaktivität. Unsere Ergebnisse zeigen einen Trend zu einer höheren Aktivität (V_{max}) der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase bei Personen mit einer niedrigen AMP-Deaminaseaktivität. Dies traf jedoch nur auf die untersuchte Gesamtkohorte zu. Der Effekt verschwand, wenn die Gruppen stratifiziert nach Genotyp (CC, CT, TT) analysiert wurden. Allerdings war die Subgruppengröße dafür sehr klein. Dazu passt der Befund, dass in der Western Blot Analyse kein Unterschied in der Expression der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase bei CC und TT Individuen zu verzeichnen war.

Als andere Erklärung könnte sich eine erhöhte Substrataffinität der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase in TT Individuen im Vergleich zu CC und CT Individuen anbieten. Wir fanden zwar eine Tendenz zu höheren K_m Werten für die zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase bei TT Individuen im Vergleich zu CC

Individuen, jedoch keinen Unterschied zwischen TT und CT Individuen. Deshalb kann anhand der vorliegenden Ergebnisse der Adenosinanstieg im Skelettmuskel nach Belastung bei Individuen mit verminderter AMP-Deaminaseaktivität und genetisch nachgewiesener homozygoter c.34C>T Mutation nicht schlüssig durch eine Veränderung in der Aktivität oder Kinetik der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase Aktivität oder einer verbesserten AMP Verfügbarkeit erklärt werden (Norman et al. 2001).

Unsere Ergebnisse sprechen eher für einen erhöhten Umsatz des akkumulierenden AMP durch eine höhere Aktivität der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase durch eine erhöhte Substratverfügbarkeit an AMP.

5.6.3 Der Einfluss der verschiedenen zytosolischen 5'-Nukleotidasen auf den AMP-Abbau im Skelettmuskel

Obwohl die Bildung von Adenosin durch unspezifische Phosphatasen durch die Zugabe von β -Glycerophosphat inhibiert wurde, lässt sich der Betrag dieser Phosphatasen zur Adenosinbildung nicht gänzlich ausschließen (Newby et al. 1975). Die Rate der Adenosinbildung aus dem Substrat AMP wurde jedoch für den Gesamtpool an zytosolischen 5'-Nukleotidasen bestimmt, ohne zwischen der AMP bevorzugenden zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase (cN-I) und der IMP bevorzugenden zytosolischen IMP 5'-Nukleotidase (cN-II) zu differenzieren. Bei Patienten mit AMP-Deaminasemangel erscheint jedoch ein Beitrag der zytosolischen IMP 5'-Nukleotidase zur Adenosinbildung noch weniger wahrscheinlich. Bis jetzt liegen jedoch noch keine Daten über das Vorkommen der zytosolischen IMP 5'-Nukleotidase im menschlichen Skelettmuskel vor (Itoh und Yamada 1991, Itoh et al. 1992, Hunsucker et al. 2001). Anhand der aktuell vorliegenden Daten aus der Literatur kann nicht abgeleitet werden, ob die zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase oder die zytosolischen IMP 5'-Nukleotidase die vorherrschende Form im menschlichen Skelettmuskel ist. Die Beurteilung der Adenosinbildung anhand eines Assays, der die kombinierten zytosolischen 5'-Nukleotidasen umfasste, erschien hinreichend für die Fragestellung der vorliegenden Studie, die die Fragestellung bearbeitete, ob eine größere Adenosinbildung bei AMP-Deaminase defizienten

Patienten durch eine veränderte Kinetik der zytosolischen 5'-Nukleotidase hervorgerufen wird.

In Tierstudien am Skelettmuskel von Katzen, Hunden und Ratten wurde eine höhere Aktivität der Gesamt 5'-Nukleotidaseaktivität in den oxidativen Typ-I-Fasern im Vergleich zu den glykolytischen Typ-II-Fasern gefunden (Camici et al. 1985, Arabadjis et al. 1993, Bockman und McKenzie 1993, Tullson und Terjung 1999). In unserer Kohorte ließ sich am Skelettmuskel eine solche Korrelation zwischen den Aktivitäten der einzelnen 5'-Nukleotidasefraktionen und den Fasertypen nicht nachweisen.

5.6.4 Die Adenosinproduktion bei AMP-Deaminasemangel und deren Auswirkungen auf den Herzmuskel

Interessanterweise zeigten mehrere klinische Studien ein verbessertes klinisches Outcome (Überleben, Vermeidung Herztransplantation) bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie oder koronarer Herzkrankheit bei Patienten mit AMPD1 c.34C>T Mutation (Feldmann et al. 1999, Loh et al. 1999, Anderson et al. 2000a, Kalsi et al. 2003, Anderson et al. 2004, Binkley et al. 2004, Finsterer et al. 2004, Gastmann et al. 2004, Yazaki et al. 2004). Es wurde spekuliert, dass der Spiegel an systemisch zirkulierendem Adenosin in AMP-Deaminase defizienten Patienten kompensatorisch erhöht ist und deshalb protektive vasodilatatorische Effekte auf die Koronararterien zustande kommen (Loh et al. 1999, Anderson et al. 2000a, Kalsi et al. 2003, Gastmann et al. 2004, Yazaki et al. 2004). Adenosin wurde als geeignete Substanz angesehen, das Voranschreiten einer Herzinsuffizienz zu hemmen, da es mit einer Vielzahl von kardioprotektiven Mechanismen in Verbindung gebracht wird (u.a. Induktion von Vasodilation, Suppression kardialer Arrhythmien, Stimulation der NO-Freisetzung, Inhibition des Fibroblastenwachstums im Myokard). Außerdem ist bekannt, dass unter koronar-/ kardioischämischen Bedingungen vermehrt Adenosin von der glatten Muskulatur des Myokards freigesetzt wird (Fenton et al. 1995). Anzumerken ist, dass die AMP-Deaminase funktionell keine Rolle im Myokard spielt.

Anhand der Ergebnisse unserer Studie lässt sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Studie von Norman et al. (2001) nicht ausschließen, dass der arbeitende Skelettmuskel als relevante Quelle von vermehrt anfallendem Adenosin fungiert. Da Adenosin, das vom Skelettmuskel produziert wird, innerhalb von Sekunden abgebaut oder von Zellen aufgenommen wird, erscheint es unwahrscheinlich, dass es den Herzmuskel oder die Koronararterien erreicht. Wenn dem so wäre, so müssten wahrscheinlichere systemische Effekte des zirkulierenden Adenosin, wie eine orthostatische Dysregulation, Schwindel, Reflertachykardie, Gesichtsrötung u. ä. eine Rolle spielen, statt die selektive Wirkung auf die Koronarien. Wenn man zudem die hohe Prävalenz der c.34C>T Mutation in der Population in Betracht zieht, scheinen andere einflussreiche, aber bislang noch unbekannt Faktoren eher eine Rolle zu spielen. Die klinischen Studien an kardiologischen Patienten sind zu kritisieren, da Erkrankungen in Beziehung zum AMP-Deaminasemangel gesetzt wurden, zu deren Entstehung unterschiedliche pathogenetische Faktoren eine Rolle spielen (koronare Herzkrankheit, dilatative Kardiomyopathie), es sich überwiegend um retrospektive Studien handelte mit zum Teil problematischen Zeitpunkten für den Beginn der Erkrankung (z. B. erster stationärer Aufenthalt) und Endpunkten (Zeitpunkt einer Herztransplantation). Außerdem wurde oft nicht zwischen TT und CT unterschieden (Loh et al. 1999, Anderson et al. 2000a, Kalsi et al. 2003, Anderson et al. 2004, Gastmann et al. 2004, Yazaki et al. 2004). In späteren Untersuchungen mit großen Kohorten konnte der positive Effekt einer c.34C>T Mutation auf das Überleben von Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt und chronischer Herzinsuffizienz nicht bestätigt werden, zum Teil zieht sich sogar ein Trend zu verringertem Überleben (Yacoub et al. 2004, Yuen et al. 2005, Kolek et al. 2005, Collins et al. 2006, De Groote et al. 2006, Agewall et al. 2006, Palmer et al. 2007, Letter De Groote et al. 2007, Taetmeyer et al. 2009).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der Untersuchung der 5'-Nukleotidasen im Skelettmuskel keine Unterschiede in den Aktivitäten der Gesamt 5'-Nukleotidase aus dem Homogenat, der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase und der Ekto-Nukleotidase im Skelettmuskel bei Patienten mit CC, CT und TT nachgewiesen werden konnte. Unsere Daten wiesen nicht darauf hin, dass die in vorherigen Studien berichtete vermehrte Bildung von Adenosin

im Skelettmuskel bei kurzzeitiger, hochintensiver Belastung durch eine erhöhte Expression oder eine veränderte Kinetik der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase bei schwerem AMP-Deaminasemangel beruht. Ein höherer Umsatz des akkumulierten AMP durch eine höhere Aktivität der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase erscheint als ein wahrscheinlicheres Szenario. Faktoren wie die Fasertypenzusammensetzung, das Alter und Geschlecht, scheinen an Hand der Daten unserer Kohorte keinen Einfluss auf die Aktivität der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase oder AMP-Deaminase zu haben.

6. SCHLUSSFOLGERUNG

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1. Unsere Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit der vorliegenden Literatur keine Unterschiede in den Allelfrequenzen von CC, CT und TT bei gesunden Kontrollen, Patienten mit Myalgien und definierten Myopathien.
2. Der TT Genotyp scheint nicht mit einem höheren Auftreten von belastungsabhängigen Beschwerden und Myalgien oder einem anderen abgrenzbaren Phänotyp assoziiert zu sein.
3. Es gibt keinen biochemischen Anhalt dafür, dass eine sekundäre AMP-Deaminasedefizienz im Gefolge einer anderen neuromuskulären Erkrankung auftritt.
4. Histochemische und biochemische Untersuchungen bieten keinen indirekten Hinweis auf das Vorkommen eines alternativen Spleißens oder einen kompensatorischen Anstieg der *AMPD3*-Genexpression bei AMP-Deaminase defizienten Personen.
5. Compound Heterozygotie bei heterozygoter c.34C>T Mutation ist selten und resultierte in unserer Kohorte nicht in biochemischen Aktivitäten, wie sie typisch für den homozygoten Karrierstatus sind.
6. Es ließen sich keine Unterschiede in den Aktivitäten der Gesamt 5'-Nukleotidase, der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase und der Ekto-Nukleotidase im Skelettmuskel bei Patienten mit CC, CT und TT nachweisen. Unsere Daten weisen nicht darauf hin, dass die in vorherigen Studien berichtete vermehrte Bildung von Adenosin im Skelettmuskel bei kurzzeitiger, hochintensiver Belastung durch eine erhöhte Expression oder eine veränderte Kinetik der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase bei schwerem AMP-Deaminasemangel beruht.

7. Faktoren wie die Fasertypenzusammensetzung, das Alter und Geschlecht, scheinen an Hand der Daten unserer Kohorte keinen Einfluss auf die Aktivität der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase oder AMP-Deaminase zu haben.

8. Es erscheint wahrscheinlicher, dass der Umsatz des akkumulierten AMP durch eine höhere Aktivität der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase bei einer erhöhten Substratverfügbarkeit an AMP erhöht ist.

9. Ein AMP-Deaminasemangel scheint *in-vivo* bei kurzzeitiger und hochintensiver Belastung weder den Citratzyklus (anaplerotische Funktion), noch die Glykolyse durch verminderte allosterische Aktivierung der Phosphofruktokinase infolge verringerter NH_3 -Bildung zu beeinflussen.

10. Anhand der Ergebnisse unserer Studie lässt sich in der Zusammenschau mit der vorliegenden Literatur keine klinische Relevanz eines biochemisch und genetisch nachweisbaren AMP-Deaminasemangels ableiten.

Eine überzeugende pathogenetische Erklärung für die Kompensation eines AMP-Deaminasemangels unter hochintensiven, kurzzeitigen anaeroben Aktivitäten der Skelettmuskulatur konnte jedoch nicht gefunden werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abe M, Higuchi I, Morisaki H, Morisaki T, Osame M. Myoadenylate deaminase deficiency with progressive muscle weakness and atrophy caused by new missense mutations in AMPD1 gene: case report in a Japanese patient. *Neuromuscul Disord.* 2000;10: 472-7
2. Abraham SL, Younathan S. Modulation of the kinetic properties of phosphofructokinase by ammonium ions. *J Biol Chem* 1971; 246: 2464-2467
3. Agewall S, Norman B. Association between AMPD1 gene polymorphism and coagulation factors in patients with coronary heart disease. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2006; 35:440-4
4. Anderson, J.L., Habashi, J., Carlquist, J.F., Muhlestein, J.B., Horne, B.D., Bair, T.L., Pearson, R.R., Hart, N. A common variant of the AMPD1 gene predicts improved cardiovascular survival in patients with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 36: 1248–1252
5. Anderson, J.L. A common variant of the AMPD1 gene predicts improved survival in patients with ischemic left ventricular dysfunction. *J. Card. Fail.* 2000a; 10: 316–320
6. Andreassi MG, Botto N, Laghi-Pasini F, Manfredi S, Ghelarducci B, Farneti A, Solinas M, Biagini A, Picano E. AMPD1 (C34T) polymorphism and clinical outcomes in patients undergoing myocardial revascularization. *Int J Cardiol.* 2005; 101:191-5
7. Arabadjis, P.G., Tullson P.C., and Terjung, R.L. Purine nucleoside formation in rat skeletal muscle fiber types. *Am. J. Physiol.*1993; 264: C1246–1251
8. Ashwal S, Peckham N. Myoadenylate deaminase deficiency in children. *Pediatr Neurol.* 1985;1:185-91

9. Baumeister FA, Gross M, Wagner DR, Pongratz D, Eife R. Myoadenylate deaminase deficiency with severe rhabdomyolysis. *Eur J Pediatr.* 1993;152:513-5
10. Bausch-Jurken MT, Mahnke-Zizelman DK, Morisaki T, Sabina RL. Molecular cloning of AMP deaminase isoform L. Sequence and bacterial expression of human AMPD2 cDNA. *J Biol Chem.* 1992; 267:22407-13
11. Bausch-Jurken MT, Sabina RL. Divergent N-terminal regions in AMP deaminase and isoform-specific catalytic properties of the enzyme. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 321:372-80
12. Binkley PF, Auseon A, Cooke G. A polymorphism of the gene encoding AMPD1: clinical impact and proposed mechanisms in congestive heart failure. *Congest Heart Fail.* 2004; 10: 274-78
13. Bockman, E.L. and McKenzie, J.E.. Tissue adenosine content in active soleus and gracilis muscles of cats. *Am. J. Physiol.* 1993; 244, H552–559
14. Brewster LM, de Visser M. Persistent hyperCKemia: fourteen patients studied in retrospect. *Acta Neurol Scand.* 1988; 77:60-3
15. Bruno C, Minetti C, Shanske S, Morreale G, Bado M, Cordone G, DiMauro S. Combined defects of muscle phosphofructokinase and AMP deaminase in a child with myoglobinuria. *Neurology.* 1998; 50: 296-8
16. Camici, M., Fini, C., and Ipata, P.L.. Isolation and kinetic properties of 59-nucleotidase from guinea-pig skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; 840, 6–12
17. Cheng, B., Essackjee, H.C., and Ballard, H.J. Evidence for control of adenosine metabolism in rat oxidative skeletal muscle by changes in pH. *J. Physiol.* 2000; 522, 467–477

18. Ciężczyk P, Eider J, Ostanek M, Leońska-Duniec A, Ficek K, Kotarska K, Girdauskas G. Is the C34T Polymorphism of the AMPD1 Gene Associated with Athlete Performance in Rowing? *Int J Sports Med.* 2011; 32: 987-91.
19. Collins RP, Palmer BR, Pilbrow AP, Frampton CM, Troughton RW, Yandle TG, Skelton L, Richards AM, Cameron VA. Evaluation of AMPD1 C34T genotype as a predictor of mortality in heart failure and post-myocardial infarction patients. *Am Heart J.* 2006; 152:312-20
20. Cooke R, Pate E. The effects of ADP and phosphate on the contraction of muscle fibers. *Biophys J.* 1985; 48(5):789-98
21. Crowther, G.J., Carey, M.F., Kemper, W.F., and Conley, K.E. Control of glycolysis in contracting skeletal muscle. I. Turning it on. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002; 282, E67–E73
22. de Groote P, Mouquet F, Dallongeville J, Lamblin N, Bauters C. The impact of the AMPD1 gene polymorphism on exercise capacity, other prognostic parameters, and survival in patients with stable congestive heart failure. A study on 686 consecutive patients. *Am Heart J.* 2007; 153:e15.
23. DiMauro S, Miranda AF, Hays AP, Franck WA, Hoffman GS, Schoenfeldt RS, Singh N. Myoadenylate deaminase deficiency--muscle biopsy and muscle culture in a patient with gout. *J Neurol Sci.* 1980; 47:191-202.
24. Eddy RL, Mahnke-Zizelman DK, Bausch-Jurken MT, Sabina RL, Shows TB,. Distribution of the AMP deaminase multigene family within the human genome: assignment of the AMPD2 to chromosome 1p21-p34 and AMPD3 to chromosome 11p13-pter. *Human Genome Mapping Workshop* 1993, 93:24.

25. Embden G und Mitarbeiter. Über die Bedeutung der Adenylsäure für die Muskelfunktion. *Z Physiol Chemie* 1928; 129: 149 ff.
26. Feldman AM, Wagner DR, McNamara DM. AMPD1 gene mutation in congestive heart failure: new insights into the pathobiology of disease progression. *Circulation*. 1999; 99:1397-9
27. Fenton RA, Galeckas KJ, Dobson JG Jr. Endogenous adenosine reduces depression of cardiac function induced by beta-adrenergic stimulation during low flow perfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2373-83.
28. Finsterer J, Schoser B, Stöllberger C. Myoadenylate-deaminase gene mutation associated with left ventricular hypertrabeculation/non-compaction. *Acta Cardiol* 2004; 59:453-6
29. Fischer S, Drenckhahn C, Wolf C, Eschrich K, Kellermann S, Froster UG, Schober R. Clinical significance and neuropathology of primary MADD in C34-T and G468-T mutations of the AMPD1 gene. *Clin Neuropathol*. 2005; 24:77-85
30. Fischer H, Esbjörnsson M, Sabina RL, Strömberg A, Peyrard-Janvid M, Norman B. AMP deaminase deficiency is associated with lower sprint cycling performance in healthy subjects. *J Appl Physiol*. 2007; 103:315-22.
31. Fishbein WN, Armbrustmacher VW, Griffin JL. Myoadenylate deaminase deficiency: a new disease of muscle. *Science* 1978; 200:545-8
32. Fishbein, W.N., Griffin, J.L., and Armbrustmacher, V.W. (1980). Stain for skeletal muscle adenylate deaminase. An effective tetrazolium stain for frozen biopsy specimens. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 1980; 104, 462–466
33. Fishbein WN, Armbrustmacher VW, Griffin JL Myoadenylate deaminase deficiency: a new disease of muscle. *Science* 1980a; 200:545–548

34. Fishbein WN, Davis JI, Foellmer JW. Kinetic and immunologic evidence for a complete gene block in myoadenylate deaminase deficiency. *J Exp Pathol.* 1983; 1:7-25
35. Fishbein WN. Changes in adenylate deaminase, adenylate kinase, and creatine kinase after prolonged storage of frozen muscle biopsies. *Muscle Nerve.* 1984; 7:340-1
36. Fishbein WN Myoadenylate deaminase deficiency: primary and secondary types. *Toxicol Ind Health* 1986; 2:105–118
37. Fishbein WN, Foellmer JW, Davis JI. Medical implications of the lactate and ammonia relationship in anaerobic exercise. *Int J Sports Med.* 1990;11 Suppl 2:S91-100
38. Fishbein WN, Sabina RL, Ogasawara N, Holmes EW. Immunologic evidence for three isoforms of AMP deaminase (AMPD) in mature skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1993;1163:97-104
39. Fishbein WN, Davis JI, Foellmer JW, Nieves S, Merezhinskaya N. A Competitive Allele-specific Oligomers Polymerase Chain Reaction Assay for the cis Double Mutation in AMPD1 That Is the Major Cause of Myoadenylate Deaminase Deficiency. *Mol Diagn* 1997; 2:121-128
40. Fishbein WN. Primary, secondary, and coincidental types of myoadenylate deaminase deficiency. *Ann Neurol.* 1999; 45:547-8
41. Fortuin FD, Morisaki T, Holmes EW. Subunit composition of AMPD varies in response to changes in AMPD1 and AMPD3 gene expression in skeletal muscle. *Proc Assoc Am Physicians.* 1996;108:329-33
42. Fricker RM, Raffelsberger T, Rauch-Shorny S, Finsterer J, Müller-Reible C, Gilly H, Bittner RE. Positive malignant hyperthermia susceptibility in vitro test in a patient with mitochondrial myopathy and myoadenylate deaminase deficiency. *Anesthesiology* 2002;97:1635-7

43. Gastmann, A, Sigusch, H.H., Henke, A., Reinhardt, D., Surber, R., Gastmann, O., and Figulla, H.R.. Role of adenosine monophosphate deaminase-1 gene polymorphism in patients with congestive heart failure: influence on tumor necrosis factor- α level and outcome. *Am. J. Cardiol* 2004; 93, 1260–1264.
44. Gertler PA, Jacobs RP. Myoadenylate deaminase deficiency in a patient with progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1984; 27:586-90
45. Goebel HH, Bardosi A, Conrad B, Kuhlendahl HD, DiMauro S, Rumpf KW. Myoadenylate deaminase deficiency. *Klin Wochenschr.* 1986; 64:342-7.
46. Gonzalez-Freire M, Santiago C, Verde Z, Lao JI, Oiiivan J, Gómez-Gallego F, Lucia A. Unique among unique. Is it genetically determined? *Br J Sports Med.* 2009; 43:307-9
47. Gross M, Morisaki H, Morisaki T, Holmes EW. Identification of functional domains in AMPD1 by mutational analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205:1010-7
48. Gross M. New method for detection of C34-T mutation in the AMPD1 gene causing myoadenylate deaminase deficiency. *Ann Rheum Dis.* 1994a; 53:353-4
49. Gross M. Molecular biology of AMP deaminase deficiency. *Pharm World Sci.* 1994b; 16: 55-61
50. Gross M. Clinical heterogeneity and molecular mechanisms in inborn muscle AMP deaminase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 1997; 20:186-92
51. Gross, M., Rotzer, E., Kolle, P., Mortier, W., Reichmann, H., Goebel, H.H., Lochmu"ller, H., Pongratz, D., Mahnke-Zizelman, D.K., and Sabina, R.L. A G468-T AMPD1 mutant allele contributes to the high incidence of myoadenylate deaminase deficiency in the Caucasian population. *Neuromuscul. Disord* 2002; 12: 558–565

52. Hand BD, Roth SM, Roltsch MH, Park JJ, Kostek MC, Ferrell RE, Brown MD. AMPD1 gene polymorphism and the vasodilatory response to ischemia. *Life Sci.* 2006; 79:1413-8
53. Hanisch F, Hellsten Y, Zierz S. Ecto- and cytosolic 5'-nucleotidases in normal and AMP deaminase-deficient human skeletal muscle. *Biol Chem.* 2006; 387:53-8
54. Hanisch F, Müller T, Muser A, Deschauer M, Zierz S. Lactate increase and oxygen desaturation in mitochondrial disorders--evaluation of two diagnostic screening protocols. *J Neurol.* 2006a; 253:417-23
55. Hanisch F, Eger K, Bork S, Lehnich H, Deschauer M, Zierz S. Lactate production upon short-term non-ischemic forearm exercise in mitochondrial disorders and other myopathies. *J Neurol.* 2006b; 253:735-40.
56. Hanisch F, Eger K, Hartl H, Scharf A, Kornhuber M, Zierz S. P.P.2.03: Increased K⁺ release during exercise in myotonic dystrophy type 1 (DM1) but not type 2 (DM2, PROMM). *Neuromuscul Dis* 2006c, 9-10: 671
57. Hanisch F, Joshi P, Zierz S. AMP deaminase deficiency in skeletal muscle is unlikely to be of clinical relevance. *J Neurol.* 2008; 255:318-22
58. Hanisch F, Zierz S. AMP Deaminase Deficiency Does Not Affect Glycolytic Capacity in Skeletal Muscle during Standardized Ischemic Forearm Exercise Test. *J Exercise Physiology* online 2011, 14
59. Hayes DJ, Summers BA, Morgan-Hughes JA. Myoadenylate deaminase deficiency or not? Observations on two brothers with exercise-induced muscle pain. *J Neurol Sci* 1982; 53:125-36

60. Heller SL, Kaiser KK, Planer GJ, Hagberg JM, Brooke MH. McArdle's disease with myoadenylate deaminase deficiency: observations in a combined enzyme deficiency. *Neurology* 1987; 37:1039-42
61. Hellsten, Y., Maclean, D., Radegran, G., Saltin, B., and Bangsbo, J. Adenosine concentrations in the interstitium of resting and contracting human skeletal muscle. *Circulation* 1998; 98, 6–8
62. Hellsten, Y. The effect of muscle contraction on the regulation of adenosine formation in rat skeletal muscle cells. *J. Physiol.* 1999; 518, 761–768
63. Hellsten, Y., Richter, E.A., Kiens, B., and Bangsbo, J. AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. *J. Physiol.* 1999a; 520, 909–920
64. Hisatome I, Morisaki T, Kamma H, Sugama T, Morisaki H, Ohtahara A, Holmes EW. Control of AMP deaminase 1 binding to myosin heavy chain. *Am J Physiol.* 1998; 275:C870-81
65. Hunsucker, S.A., Spychala, J., and Mitchell, B.S. (2001). Human cytosolic 59-nucleotidase I: characterization and role in nucleotide analog resistance. *J. Biol. Chem.* 276, 10498–10504.
66. Isackson PJ, Bujnicki H, Harding CO, Vladutiu GD Myoadenylate deaminase deficiency caused by alternative splicing due to a novel intronic mutation in the AMPD1 gene. *Mol Genet Metab* 2005; 86:250–256
67. Itoh, R. and Yamada, K. Determination of cytoplasmic 59-nucleotidase which preferentially hydrolyses 6-hydroxypurine nucleotides in pig, rat and human tissues by immunotitration. *Int. J. Biochem.* 1991; 23, 461–465

68. Itoh, R., Echizen, H., Higuchi, M., Oka, J., and Yamada, K. A comparative study on tissue distribution and metabolic adaptation of IMP-GMP 59-nucleotidase. *Comp. Biochem. Physiol.* 1992; B 103, 153–159
69. Joosten E, van Bennekom C, Oerlemans F, De Bruyn C, Oei T, Trijbels J. Myoadenylate deaminase deficiency: an enzyme defect in search of a disease. *Adv Exp Med Biol.* 1984; 165 Pt A:85-9
70. Juffer P, Furrer R, González-Freire M, Santiago C, Verde Z, Serratos L, Morate FJ, Rubio JC, Martin MA, Ruiz JR, Arenas J, Gómez-Gallego F, Lucia A. Genotype distributions in top-level soccer players: a role for ACE? *Int J Sports Med.* 2009; 30:387-92
71. Kalsi, K.K., Yuen, A.H., Rybakowska, I.M., Johnson, P.H., Slominska, E., Birks, K. Kaletha, K., Yacoub, M.H., and Smolenski, R.T. Decreased cardiac activity of AMP deaminase in subjects with the AMPD1 mutation – a potential mechanism for protection in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 2003; 59, 678–684
72. Kaletha K, Nowak G. Developmental forms of human skeletal-muscle AMP deaminase. The kinetic and regulatory properties of the enzyme. *Biochem J.* 1988; 249, 255-61
73. Kar NC, Pearson CM. Muscle adenylic acid deaminase activity. Selective decrease in early-onset Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 1973; 23:478-82
74. Kar NC, Pearson CM. Muscle adenylate deaminase deficiency. Report of six new cases. *Arch Neurol.* 1981; 38:279-81
75. Katz A, Sahlin K, Henriksson J. Muscle ammonia metabolism during isometric contraction in humans. *Am J Physiol.* 1986; 250:C834-40.
76. Kirsten E, Gerez C, Kirsten R. An enzymatic microdetermination method for ammonia, specifically for extracts of animal tissues and fluids. Determination of NH₄ ions in blood. *Biochem Z.* 1963; 337:312-9

77. Kolek MJ, Carlquist JF, Thaneemit-Chen S, Lazzeroni LC, Whiting BM, Horne BD, Muhlestein JB, Lavori P, Anderson JL. The role of a common adenosine monophosphate deaminase (AMPD)-1 polymorphism in outcomes of ischemic and nonischemic heart failure. *Card Fail.* 2005; 11:677-83
78. Kelemen J, Rice DR, Bradley WG, Munsat TL, DiMauro S, Hogan EL. Familial myoadenylate deaminase deficiency and exertional myalgia. *Neurology.* 1982; 32:857-63
79. Lally EV, Friedman JH, Kaplan SR. Progressive myalgias and polyarthralgias in a patient with myoadenylate deaminase deficiency. *Arthritis Rheum.* 1985; 28:1298-302
80. Loh, E., Rebbeck, T.R., Mahoney, P.D., DeNofrio, D., Swain, J.L., and Holmes, E.W.. Common variant in AMPD1 gene predicts improved clinical outcome in patients with heart failure. *Circulation* 1999; 99: 1422–1425
81. Lowenstein J, Tornheim K. Ammonia production in muscle: the purine nucleotide cycle. *Science.* 1971; 171:397-400
82. Lowenstein JM. Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiol Rev.* 1972; 52:382-414.
83. Lowenstein JM, Goodman MN. The purine nucleotide cycle in skeletal muscle. *Fed Proc.* 1978; 37:2308-12
84. Lowenstein JM. The purine nucleotide cycle revisited [corrected]. *Int J Sports Med.* 1990;11:S37-46. Erratum in: *Int J Sports Med* 1990; 11:411
85. Lucia A, Martin MA, Esteve-Lanao J, San Juan AF, Rubio JC, Oliván J, Arenas J. C34T mutation of the AMPD1 gene in an elite white runner. *Br J Sports Med.* 2006;40:e7

86. Lynge, J., Juel, C., and Hellsten, Y. Extracellular formation and uptake of adenosine during skeletal muscle contraction in the rat: role of adenosine transporters. *J. Physiol.* 2001; 537, 597–605
87. Mahnke-Zizelman DK, Sabina RL. Cloning of human AMP deaminase isoform E cDNAs. Evidence for a third AMPD gene exhibiting alternatively spliced 5'-exons. *J Biol Chem* 1992; 267:20866–20877
88. Mahnke-Zizelman DK, van den Bergh F, Bausch-Jurken MT, Eddy R, Sait S, Shows TB, Sabina RL. Cloning, sequence and characterization of the human AMPD2 gene: evidence for transcriptional regulation by two closely spaced promoters. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1308:122-32
89. Mahnke-Zizelman DK, D'cunha J, Wojnar JM, Brogley MA, Sabina RL. Regulation of rat AMP deaminase 3 (isoform C) by development and skeletal muscle fibre type. *Biochem J.* 1997;326:521-9
90. Mahnke-Zizelman DK, Tullson PC, Sabina RL. Novel aspects of tetramer assembly and N-terminal domain structure and function are revealed by recombinant expression of human AMP deaminase isoforms. *J Biol Chem.* 1998; 273:35118-25
91. Mahnke-Zizelman DK, Sabina RL. Localization of N-terminal sequences in human AMP deaminase isoforms that influence contractile protein binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285:489-95
92. Mahnke-Zizelman DK, Sabina RL. N-terminal sequence and distal histidine residues are responsible for pH-regulated cytoplasmic membrane binding of human AMP deaminase isoform E. *J Biol Chem.* 2002;277:42654-62.
93. Marin R, Connick E. Tension myalgia versus myoadenylate deaminase deficiency: a case report. *Arch Phys Med Rehabil.* 1997; 78:95-7

94. Marquetant R, Desai NM, Sabina RL, Holmes EW. Evidence for sequential expression of multiple AMP deaminase isoforms during skeletal muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:2345-9
95. Martinuzzi A, Sartori E, Fanin M, Nascimbeni A, Valente L, Angelini C, Siciliano G, Mongini T, Tonin P, Tomelleri G, Toscano A, Merlini L, Bindoff LA, Bertelli S. Phenotype modulators in myophosphorylase deficiency. *Ann Neurol.* 2003;53:497-502
96. Mercelis R, Martin JJ, Dehaene I, de Barys T, Van den Berghe G. Myoadenylate deaminase deficiency in a patient with facial and limb girdle myopathy. *J Neurol.* 1981; 225:157-66
97. Mercelis R, Martin JJ, de Barys T, Van den Berghe G. Myoadenylate deaminase deficiency: absence of correlation with exercise intolerance in 452 muscle biopsies. *J Neurol.* 1987; 234:385-9
98. Meyer RA, Terjung RL. Differences in ammonia and adenylate metabolism in contracting fast and slow muscle. *Am J Physiol.* 1979; 237:C111-8
99. Mineo I, Clarke PR, Sabina RL, Holmes EW. A novel pathway for alternative splicing: identification of an RNA intermediate that generates an alternative 5' splice donor site not present in the primary transcript of AMPD1. *Mol Cell Biol.* 1990; 10:5271-8
100. Mineo I, Holmes EW. Exon recognition and nucleocytoplasmic partitioning determine AMPD1 alternative transcript production. *Mol Cell Biol.* 1991; 11:5356-63
101. Morisaki T, Sabina RL, Holmes EW. Adenylate deaminase. A multigene family in humans and rats. *J Biol Chem.* 1990; 265:11482-6
102. Morisaki T, Gross M, Morisaki H, Pongratz D, Zöllner N, Holmes EW. Molecular basis of AMP deaminase deficiency in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89:6457-61

103. Morisaki T, Holmes EW. Functionally distinct elements are required for expression of the AMPD1 gene in myocytes. *Mol Cell Biol.* 1993; 13:5854-60
104. Morisaki H, Morisaki T, Newby LK, Holmes EW. Alternative splicing: a mechanism for phenotypic rescue of a common inherited defect. *J Clin Invest* 1993a; 91:2275–2280
105. Morisaki H, Higuchi I, Abe M, Osame M, Morisaki T. First missense mutations (R388W and R425H) of AMPD1 accompanied with myopathy found in a Japanese patient. *Hum Mutat* 2000; 16:467–472
106. Morisaki H, Morisaki T, Kariko K, Genetta T, Holmes EW. Positive and negative elements mediate control of alternative splicing in the AMPD1 gene. *Gene.* 2000a; 246:365-72
107. Muniesa CA, González-Freire M, Santiago C, Lao JI, Buxens A, Rubio JC, Martín MA, Arenas J, Gomez-Gallego F, Lucia A. World-class performance in lightweight rowing: is it genetically influenced? A comparison with cyclists, runners and non-athletes. *Br J Sports Med.* 2010; 44:898-901
108. Nagao H, Habara S, Morimoto T, Sano N, Takahashi M, Kida K, Matsuda H. AMP deaminase activity of skeletal muscle in neuromuscular disorders in childhood. Histochemical and biochemical studies. *Neuropediatrics.* 1986; 17:193-8
109. Newby, A.C., Luzio, J.P., and Hales, C.N. The properties and extracellular location of 59 nucleotidase of the rat fat-cell plasma membrane. *Biochem. J.* 1975; 146, 625–633.
110. Norman, B., Mahnke-Zizelman, D.K., Vallis, A., and Sabina, R.L. Genetic and other determinants of AMP deaminase activity in healthy adult skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 1998; 85, 1273–1278

111. Norman B, Sabina RL, Jansson E. Regulation of skeletal muscle ATP catabolism by AMPD1 genotype during sprint exercise in asymptomatic subjects. *J Appl Physiol.* 2001;91:258-64
112. Norman B, Nygren AT, Nowak J, Sabina RL. The effect of AMPD1 genotype on blood flow response to sprint exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2008; 103:173-80
113. Nowak G, Kaletha K. Molecular forms of human heart muscle AMP deaminase. *Biochem Med Metab Biol.* 1991; 46:263-6.
114. Ogasawara N, Goto H, Yamada Y, Watanabe T, Asano T. AMP deaminase isozymes in human tissues. *Biochim Biophys Acta.* 1982; 714:298-306
115. Ogasawara N, Goto H, Yamada Y. AMP deaminase isozymes in rabbit red and white muscles and heart. *Comp Biochem Physiol B.* 1983; 76:471-3
116. Ogasawara N, Goto H, Yamada Y, Nishigaki I, Itoh T, Hasegawa I, Park KS. Deficiency of AMP deaminase in erythrocytes. *Hum Genet.* 1987; 75:15-8
117. Palmer BR, Frampton CM, Richards AM, Cameron VA. AMPD1 gene polymorphism and survival in patients with stable congestive heart failure. *Am Heart J.* 2007; 153:e13
118. Parnas JK. Über den Purinstoffwechsel am Muskel und über die Muttersubstanz des im Muskel entstehenden Ammoniak. *Klein Wochenschrift* 1928; 7:1423ff
119. Pennington RJ. 5'-Adenylic acid deaminase in dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1961; 192:884-5

120. Pérez M, Martín MA, Cañete S, Rubio JC, Fernández-Moreira D, San Juan AF, Gómez-Gallego F, Santiago C, Arenas J, Lucia A. Does the C34T mutation in AMPD1 alter exercise capacity in the elderly? *Int J Sports Med.* 2006;27:429-35
121. Radegran, G. and Hellsten, Y Adenosine and nitric oxide in exercise-induced human skeletal muscle vasodilatation. *Acta Physiol. Scand.* 2000; 168, 575–591
122. Raggi A, Ronco-Testoni S, Ronca G. Muscle AMP aminohydrolase. II. Distribution of AMP aminohydrolase, myokinase and creatine kinase activities in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1969; 178:619-22
123. Ranieri-Raggi M, Montali U, Ronca F, Sabbatini A, Brown PE, Moir AJ, Raggi A. Association of purified skeletal-muscle AMP deaminase with a histidine-proline-rich-glycoprotein-like molecule. *Biochem J.* 1997; 326:641-8
124. Reuschenbach C, Zierz S. Mutant carnitine palmitoyltransferase associated with myoadenylate deaminase deficiency in skeletal muscle. *J Pediatr.* 1988; 112:600-3
125. Rico-Sanz J, Rankinen T, Joanisse DR, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C; HERITAGE Family study. Associations between cardiorespiratory responses to exercise and the C34T AMPD1 gene polymorphism in the HERITAGE Family Study. *Physiol Genomics.* 2003; 14:161-6
126. Riksen NP, Franke B, Oyen WJ, Borm GF, van den Broek P, Boerman OC, Smits P, Rongen GA. Augmented hyperaemia and reduced tissue injury in response to ischaemia in subjects with the 34C > T variant of the AMPD1 gene. *Eur Heart J.* 2007; 28:1085-91
127. Rohnd, J.M., Matthews, Y., and Jones, D.A. A quick simple and reliable method for ATPase in human muscle preparations. *Histochem. J.* 1980; 12, 707–709

128. Rossi LN, Cornelio F, Dworzak F, Morandi L, Rossi G, Di Mauro S. Myoadenylate deaminase deficiency in a 5-year-old boy with intermittent muscle pain. *Helv Paediatr Acta*. 1984; 39:89-93
129. Rubio JC, Martín MA, Del Hoyo P, Bautista J, Campos Y, Segura D, Navarro C, Ricoy JR, Cabello A, Arenas J. Molecular analysis of Spanish patients with AMP deaminase deficiency. *Muscle Nerve*. 2000; 23:1175-8
130. Rubio JC, Martín MA, Rabadán M, Gómez-Gallego F, San Juan AF, Alonso JM, Chicharro JL, Pérez M, Arenas J, Lucia A. Frequency of the C34T mutation of the AMPD1 gene in world-class endurance athletes: does this mutation impair performance? *J Appl Physiol*. 2005; 98:2108-12
131. Rubio JC, Gómez-Gallego F, Santiago C, García-Consuegra I, Pérez M, Barriopedro MI, Andreu AL, Martín MA, Arenas J, Lucia A. Genotype modulators of clinical severity in McArdle disease. *Neurosci Lett*. 2007;422:217-22
132. Rubio JC, Pérez M, Maté-Muñoz JL, García-Consuegra I, Chamorro-Viña C, Fernández del Valle M, Andreu AL, Martín MA, Arenas J, Lucia A. AMPD1 genotypes and exercise capacity in McArdle patients. *Int J Sports Med*. 2008; 29:331-5
133. Ruiz JR, Gómez-Gallego F, Santiago C, González-Freire M, Verde Z, Foster C, Lucia A. Is there an optimum endurance polygenic profile? *J Physiol*. 2009; 587:1527-34
134. Rundell, K.W., Tullson, P.C., and Terjung, R.L. Altered kinetics of AMP deaminase by myosin binding. *Am. J. Physiol*. 1992; 263, C294–299
135. Sabina, R.L., Swain, J.L., Olanow, C.W., Bradley, W.G., Fishbein, W.N., DiMauro, S., and Holmes, H.W. Myoadenylate deaminase deficiency. Functional and metabolic abnormalities associated with disruption of the purine nucleotide cycle. *J. Clin. Invest*. 1984; 73, 720–730

136. Sabina RL, Morisaki T, Clarke P, Eddy R, Shows TB, Morton CC, Holmes EW. Characterization of the human and rat myoadenylate deaminase genes. *J Biol Chem.* 1990; 265:9423-33
137. Sabina RL, Fishbein WN, Pezeshkpour G, Clarke PR, Holmes EW. Molecular analysis of the myoadenylate deaminase deficiencies. *Neurology.* 1992; 42:170-9
138. Sabina RL, Mahnke-Zizelman DK. Towards an understanding of the functional significance of N-terminal domain divergence in human AMP deaminase isoforms. *Pharmacol Ther.* 2000;87:279-83
139. Sahlin K, Palmskog G, Hultman E. Adenine nucleotide and IMP contents of the quadriceps muscle in man after exercise. *Pflugers Arch.* 1978; 374:193-8
140. Santiago C, Ruiz JR, Muniesa CA, González-Freire M, Gómez-Gallego F, Lucia A. Does the polygenic profile determine the potential for becoming a world-class athlete? Insights from the sport of rowing. *Scand J Med Sci Sports.* 2010; 20:e188-94
141. Sarzynski MA, Rankinen T, Sternfeld B, Grove ML, Fornage M, Jacobs DR Jr, Sidney S, Bouchard C. Association of single-nucleotide polymorphisms from 17 candidate genes with baseline symptom-limited exercise test duration and decrease in duration over 20 years: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) fitness study. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3:531-8
142. Schmidt G. Über fermentative Desaminierung im Muskel. *Z Physiol Chem* 1928; 179: 243 und 261
143. Serratrice G, Pellissier JF, Aquaron R, Pouget J. AMP deaminase deficiency (myoadenylate deaminase). Disease or syndrome?. *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1986;53:673-6
144. Shumate JB, Katnik R, Ruiz M, Kaiser K, Frieden C, Brooke MH, Carroll JE. Myoadenylate deaminase deficiency. *Muscle Nerve.* 1979;2(3):213-6

145. Sinkeler S, Joosten E, Wevers R, Binkhorst R, Oei L. Skeletal muscle adenosine, inosine and hypoxanthine release following ischaemic forearm exercise in myoadenylate deaminase deficiency and McArdle's disease. *Adv Exp Med Biol.* 1986; 195:517-23
146. Skyllouriotis ML, Marx M, Bittner RE, Skyllouriotis P, Gross M, Wimmer M. Myoadenylate deaminase deficiency, hypertrophic cardiomyopathy and gigantism syndrome. *Pediatr Neurol.* 1997; 17:61-6
147. Sugden PH, Newaholme EA, The effects of ammonia. Inorganic phosphate and potassium ions on the activity of phosphofructokinase from muscle and nervous tissue of vertebrates and invertebrates, *Biochem.J.* 150 (1975) 113-122.
148. Swain JL, Hines JJ, Sabina RL, Harbury OL, Holmes EW. Disruption of the purine nucleotide cycle by inhibition of adenylosuccinate lyase produces skeletal muscle dysfunction. *J Clin Invest.* 1984; 74:1422-7
149. Taegtmeier AB, Breen JB, Rogers P, Johnson PH, Smith J, Smolenski RT, Banner NR, Yacoub MH, Barton PJ. Effect of adenosine monophosphate deaminase-1 C34T allele on the requirement for donor inotropic support and on the incidence of early graft dysfunction after cardiac transplantation. *Am J Cardiol.* 2009; 103:1457-62
150. Tarnopolsky, M.A., Parise, G., Gibala, M.J., Graham, T.E., and Rush, J.W.E. Myoadenylate deaminase deficiency does not affect muscle anaplerosis during exhaustive exercise in humans. *J. Physiol.* 2001; 533, 881–889
151. Tarnopolsky M, Stevens L, Macdonald JR, Rodriguez C, Mahoney D, Rush J, et al. Diagnostic utility of a modified forearm ischemic exercise test and technical issues relevant to exercise testing. *Muscle Nerve* 2003; 27:359-66

152. Toyama K, Morisaki H, Kitamura Y, Gross M, Tamura T, Nakahori Y, Vance JM, Speer M, Kamatani N, Morisaki T. Haplotype analysis of human AMPD1 gene: origin of common mutant allele. *J Med Genet.* 2004;41(6):e74
153. Tsianos GI, Evangelou E, Boot A, Zillikens MC, van Meurs JB, Uitterlinden AG, Ioannidis JP. Associations of polymorphisms of eight muscle- or metabolism-related genes with performance in Mount Olympus marathon runners. *J Appl Physiol.* 2010; 108:567-74
154. Tsujino S, Shanske S, Carroll JE, Sabina RL, DiMauro S. Double trouble: combined myophosphorylase and AMP deaminase deficiency in a child homozygous for nonsense mutations at both loci. *Neuromuscul Disord.* 1995; 5:263-6
155. Tullson, P.C., Whitlock, D.M., and Terjung, R.L. Adenine nucleotide degradation in slow-twitch red muscle. *Am. J. Physiol.* 1990; 258, C258–265
156. Tullson, P.C. and Terjung, R.L. Adenosine nucleotide metabolism in contracting skeletal muscle. *Exer. Sport Sci. Rev.* 1991; 14, 507–536
157. Tullson PC, Rush JW, Wieringa B, Terjung RL. Alterations in AMP deaminase activity and kinetics in skeletal muscle of creatine kinase-deficient mice. *Am J Physiol.* 1998; 274:C1411-6
158. Tullson, P.C. and Terjung, R.L. IMP degradative capacity in rat skeletal muscle fiber types. *Mol. Cell. Biochem.* 1999; 199, 111–117
159. Uziel G, Cornelio F, Gellera C, Perego C, Rimoldi M, DiDonato S. Myoadenylate deaminase deficiency in twins with recessive olivopontocerebellar atrophy. *Ital J Neurol Sci.* 1986; 7:107-12

160. Van Kuppevelt TH, Veerkamp JH, Fishbein WN, Ogasawara N, Sabina RL. Immunolocalization of AMP deaminase isozymes in human skeletal muscle and cultured muscle cells: concentration of isoform M at the neuromuscular junction. *J Histochem Cytochem* 1994; 42:861–868
161. Van den Berghe G, Bontemps F, Vincent MF, Van den Bergh F. The purine nucleotide cycle and its molecular defects. *Prog Neurobiol.* 1992;39:547-61
162. Verzijl, H.T., van Engelen, B.G., Luyten, J.A., Steenbergen, G.C., van den Heuvel, L.P., ter Laak, H.J., Padberg, G.W., and Wevers, R.A. Genetic characterization of myoadenylate deaminase deficiency. *Ann. Neurol.* 1998; 44, 140–143
163. Wagner DR, Gresser U, Zöllner N. Effects of oral ribose on muscle metabolism during bicycle ergometer in AMPD-deficient patients. *Ann Nutr Metab.* 1991; 35:297-302
164. Wang X, Morisaki H, Sermsuvitayawong K, Mineo I, Toyama K, Ogasawara N, Mukai T, Morisaki T. Cloning and expression of cDNA encoding heart-type isoform of AMP deaminase. *Gene.* 1997; 188:285-90
165. Westerblad H, Allen DG. Relaxation, $[Ca^{2+}]_i$ and $[Mg^{2+}]_i$ during prolonged tetanic stimulation of intact, single fibres from mouse skeletal muscle. *J Physiol.* 1994; 480:31-43
166. Westerblad H, Allen DG, Bruton JD, Andrade FH, Lännergren J. Mechanisms underlying the reduction of isometric force in skeletal muscle fatigue. *Acta Physiol Scand.* 1998; 162:253-60
167. Wheeler TJ, Lowenstein JM. Adenylate deaminase from rat muscle. Regulation by purine nucleotides and orthophosphate in the presence of 150 mM KCl. *J Biol Chem.* 1979; 254:8994-9

168. Winder WW, Terjung RL, Baldwin KM, Holloszy JO. Effect of exercise on AMP deaminase and adenylosuccinase in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1974; 227:1411-4
169. Yacoub MH, Yuen AH, Kalsi KK, Birks EJ, Taegtmeier A, Barton PJ, Johnson PH, Suzuki K, Smolenski RT. C34T AMP deaminase 1 gene mutation protects cardiac function in donors. *Transplantation.* 2004; 77:1621-3
170. Yamada Y, Goto H, Ogasawara N. Cloning and nucleotide sequence of the cDNA encoding human erythrocyte-specific AMP deaminase. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1171:125-8
171. Yamada Y, Goto H, Murase T, Ogasawara N. Gene mutations for human erythrocyte AMP deaminase deficiency. *Adv Exp Med Biol.* 1994; 370:703-6
172. Yazaki, Y., Muhlestein, J.B., Carlquist, J.F., Bair, T.L., Horne, B.D., Renlund, D.G., and Anderson, J.L. A common variant of the AMPD1 gene predicts improved survival in patients with ischemic left ventricular dysfunction. *J. Card. Fail.* 2004; 10, 316–320
173. Yuen AH, Yacoub MH, Birks EJ, Kalsi KK, Johnson PH, Smolenski RT. Association of improved cardiac function in donors with C34T mutation of the AMP deaminase 1 gene. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2005; 24:275-7
174. Yun S, Suelter CH. Human erythrocyte 5'-AMP aminohydrolase. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 1978; 253:404-8
175. Zimmer C, Altenkirch H, Dorfmueller-Kuechlin S, Pongratz D, Paetzke I, Gosztanyi G. Type 2a fibre rhabdomyolysis in myoadenylate deaminase deficiency. *J Neurol.* 1991; 238:31-3
176. Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362, 299–309

177. Zöllner, N., Reiter, S., and Gross, M. (1986). Myoadenylate deaminase deficiency: successful symptomatic therapy by high dose oral administration of ribose. *Klin.Wochenschr.* 64, 1281–1290

8. VERZEICHNIS DER FREMD- UND FACHWORTERLÄUTERUNGEN

Anaplerotische Funktion - (griechisch: auffüllen) Umfasst Reaktionen aus verschiedenen Stoffwechselwegen, die Intermediate des Citratzyklus bereitstellen.

Citratzyklus – (Synonyma Tricarbonsäurezyklus, Krebs-Zyklus) Das beim Abbau von Lipiden, Glykogen und Aminosäuren als Zwischenprodukt entstehende Acetyl-CoA wird darin in den Mitochondrien zu CO₂ und H₂O abgebaut, wobei für den Anabolismus des Organismus nutzbare Zwischenprodukte gebildet werden und direkt und indirekt Energie in biochemisch verfügbarer Form als ATP gebildet wird.

Michaelis-Menten-Konstante - (Abkürzung: K_m) Beschreibt diejenige Substratkonzentration, bei der ein Enzym mit der Hälfte seiner maximalen Geschwindigkeit arbeitet, d. h. 50% der Enzymmoleküle in einem System als Enzym-Substrat-Komplex vorliegen. Sie ist somit ein Maß für die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat.

Purinnukleotidzyklus – Salvage-Pathway im Zytoplasma zur Bildung von Mononukleotiden, der energieeffizienter als die De-novo-Biosynthese von Purinnukleotiden ist.

Typ-I Muskelfaser – (Synonym: oxidative Faser) Langsam kontrahierende und langsam ermüdende Muskelfaser, auch durch die hohe Myoglobinkonzentration dunkle oder rote Faser genannt. Energiegewinnung vorwiegend aerob.

Typ-II-Faser – (Synonym glykolytische Faser) Schneller kontrahierende und rascher ermüdende Muskelfasern, die auch helle oder weiße Faser genannt wird. Anaerobe Energiegewinnung.

9. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

9.1 ABBILDUNGEN

	Seite
1	Der Purinnukletidzyklus und dessen Interaktion mit anderen Stoffwechselwegen..... 15
2	Alternativer Abbauweg des AMP über die zytosolische AMP-5'-Nukleotidase..... 22
3	Das Handkraftmessgerät..... 28
4	Histochemische Darstellung von Typ-I und Typ-II-Muskelfasern mit der myofibrillären ATPase (pH 9.4) Färbung..... 30
5	Histochemische Darstellung der AMP-Deaminase mittels p- Nitroblau Tetrazolium 31
6	Darstellung der Veränderungen bei <i>AMPD1</i> c.34C>T Mutation. ... 34
7	Polyamidgel mit Darstellung der aufgetrennten Amplifikate bei TT, CT und CC..... 35
8	Darstellung einer heterozygoten <i>AMPD1</i> c.860A>T Mutation..... 36
9	AMP-Deaminaseaktivität bei gesunden und erkrankten Personen bezogen auf den <i>AMPD1</i> c.35C>T Genotyp 42
10	Darstellung der Korrelation zwischen AMP-Deaminase und zytosolischer AMP 5'-Nukleotidaseaktivität im Skelettmuskel..... 44

11	Darstellung der Korrelation zwischen Alter und zytosolischer AMP 5'-Nukleotidaseaktivität im Skelettmuskel.....	46
12	Darstellung der Korrelation zwischen Häufigkeit von Typ-I-Fasern und zytosolischer AMP 5'-Nukleotidaseaktivität im Skelettmuskel.	47
13	Western Blot Analyse mit dem cN-I Antikörper.....	47

9.2 TABELLEN

	Seite
1	Auflistung der Primerpaare zur Sequenzierung des <i>AMPD1</i> 37
2	Klinische, elektrophysiologische und histologische Parameter der Studienkohorten..... 40
3	Verteilung der c.34C>T Mutationshäufigkeit auf die einzelnen Studienkohorten..... 41
4	Aktivitäten der AMP-Deaminase und verschiedener Nukleotidasen bei Patienten mit unterschiedlichen c.34C>T Genotypen..... 45
5	Ergebnis des standardisierten ischämischen Handkrafttestes bezogen auf den c.34C>T Genotyp..... 49
6.	Ergebnis des standardisierten ischämischen Handkrafttestes stratifiziert nach gesunden CT, CT mit Myalgien, CT mit Myopathie..... 50
7	Häufigkeit der c.34C>T Mutation in verschiedenen Populationen und Kohorten..... 55
8.	Häufigkeit der c.34C>T Mutation bei Hochleistungssportlern..... 56

10. THESEN

1. Das Enzym AMP-Deaminase baut unter kurzzeitiger, hochintensiver Belastung AMP zu IMP und Ammoniak ab. Die homozygote c.34C>T Stopmutation im *AMPD1* Gen, das für die muskelspezifische Isoform der AMP-Deaminase kodiert, ist für den größten Teil eines biochemisch und histologisch nachweisbaren AMP-Deaminasemangels im Skelettmuskel verantwortlich. Aufgrund seiner Funktion, könnte ein AMP-Deaminasemangel mit belastungsabhängigen Beschwerden assoziiert sein.
2. Unsere Untersuchung von 401 Proben zeigte in Übereinstimmung mit der vorliegenden Literatur keine Unterschiede in der Häufigkeit von homozygoter und heterozygoter c.34C>T Mutation bei gesunden Kontrollen, Patienten mit Myalgien und belastungsabhängigen Beschwerden sowie definierten Myopathien.
3. Ein AMP-Deaminasemangel bei homozygoter c.34C>T Mutation scheint nicht mit einem höheren Auftreten von belastungsabhängigen Beschwerden und Myalgien oder einem anderen abgrenzbaren Phänotyp assoziiert zu sein.
4. Es gibt in unserer Kohorte weder einen biochemischen Anhalt, noch einen laborchemischen Hinweis im Funktionsstest (standardisierte Handkraftdynamometermessung) dafür, dass eine sekundäre AMP-Deaminasedefizienz im Gefolge einer anderen neuromuskulären Erkrankung auftritt.
5. Histochemische und biochemische Untersuchungen bieten keinen indirekten Hinweis auf das Vorkommen eines alternativen Spleißens im *AMPD1* Gen oder einen kompensatorischen Anstieg anderer AMP-Deaminase-Isoformen (z. B. der *AMPD3*-Genexpression) bei AMP-Deaminase defizienten Personen.
6. Compound Heterozygotie bei heterozygoter c.34C>T Mutation ist selten und resultierte in unserer Kohorte nicht in biochemischen Aktivitäten, wie

sie typisch für den homozygoten Karrierstatus der c.34C>T Mutation sind.

7. Bei AMP-Deaminasemangel könnte der Abbau von AMP zu Adenosin durch zytosolische AMP-5'-Nukleotidasen als alternativer Abbauweg bei AMP-Deaminasemangel eine Rolle spielen, wobei 5'-Nukleotidasen im menschlichen Skelettmuskel bislang bisher nicht untersucht waren.
8. Es ließen sich keine Unterschiede in den Aktivitäten der Gesamt 5'-Nukleotidase, der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase und der Ekto-Nukleotidase im Skelettmuskel bei Patienten mit und ohne c.34C>T Mutation nachweisen.
9. Die Ergebnisse unserer Studie deuten darauf hin, dass eine vermehrte Bildung von Adenosin im Skelettmuskel bei kurzzeitiger, hochintensiver Belastung, wie in früherern Funktionsstudien berichtet, nicht durch eine erhöhte Expression oder eine veränderte Kinetik der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase bei AMP-Deaminasemangel bedingt ist. Eher scheint der Umsatz des akkumulierten AMP durch eine höhere Aktivität der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase bei einer erhöhten Substratverfügbarkeit an AMP erhöht zu sein.
10. Faktoren wie die Fasertypenzusammensetzung, das Alter und Geschlecht, scheinen an Hand der Daten unserer Kohorte weder einen Einfluss auf die Aktivität der zytosolischen AMP 5'-Nukleotidase, noch auf die Aktivität der AMP-Deaminase zu haben.
11. In in-vitro Studien wirkte Ammoniak als positiver Effektor der Glykogenolyse durch allosterische Aktivierung der Phosphofruktokinase. Im standardisierten ischämischen Handkrafttest (kurzzeitige und hochintensive Belastung) zeigte sich *in-vivo* bei AMP-Deaminasemangel keine verminderte Laktatproduktion bezogen auf die Muskelarbeit, d. h. die Effizienz der Glykogenolyse infolge verminderter Ammoniak-Produktion war nicht beeinträchtigt.

11. TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Geboren am 12.03.1971 in Altdöbern (DDR)

1977.1987 Grundschule „Paul Behr“ in Gröditz

1981.1987 Polytechnische Oberschule “Armin Walter” in Gröditz

1987.1989 Erweiterte Oberschule „Max Planck“ (Gymnasium) in Riesa

1989 Abitur, Jahrgangsbester

1990.1998 Medizinstudium an der Universität Leipzig

1993-1994 Studienunterbrechung zur Durchführung der experimentellen Arbeit im Rahmen der Dissertation am Institut für Hirnforschung „Paul Flechsig“ Leipzig (Doktorvater: Prof. T. Arendt)

1997.1998 Praktisches Jahr

1998 3. Staatsexamen; Approbation als Arzt

1999 Promotion, Note summa cum laude

1999.2000 Arzt im Praktikum (AiP) an der Neurologischen Klinik, Helios Klinikum Erfurt (Direktor: Prof. Kölmel)

seit 10/2000 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. S. Zierz)

2004.2005 Stipendiat im Rahmen des Roux-Projektes des Landes Sachsen-Anhalt und der Universität Halle-Wittenberg

2006-2007 Stipendiat der European Neurological Society und der Action Medical Research am Institute of Human Genetics in Newcastle upon Tyne (Großbritannien) sowie ärztliche Tätigkeit am Muskelzentrum des Centre for Life Newcastle (Direktor: Prof. K. Bushby)

08/2009 Anerkennung als Facharzt für Neurologie

12. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. S. Zierz, Direktor der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möchte ich herzlich danken, sowohl für die Möglichkeit einer Forschungstätigkeit als auch für die Unterstützung dieser Arbeit durch die Gewährung von Freiräumen für die Forschungstätigkeit und die Einführung in das wissenschaftliche Publizieren. .

Herrn Professor Dr. Deschauer als Leiter des Muskellabors der Neurologischen Klinik möchte ich für seine fachliche Unterstützung im Bereich der PCR-Technik und die Zusammenarbeit in mehreren Projekten zu Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei Myopathien danken. Mein Dank gehört auch Herrn PD Dr. Kornhuber für die Ausbildung und die Zusammenarbeit im Bereich der Elektrophysiologie, einschließlich der Zusammenarbeit in mehreren elektrophysiologisch orientierten klinischen Studien. Danken möchte ich ebenfalls Herrn Dr. Tobias Müller für die Möglichkeit, myohistologisch zu arbeiten und die Zusammenarbeit in mehreren Studien im Grenzgebiet von Myologie und neurologischer Intensivmedizin.

Während meines Jahres als Stipendiat des Roux-Programmes wurde ich hervorragend in diverse molekulargenetische Arbeitstechniken durch Herrn Dr. rer. nat. Christov eingeführt. Seine geistreichen Anekdoten aus dem Gebiet der naturwissenschaftlichen Forschung und die bei ihm erworbenen Kenntnisse halfen mir außerordentlich während meines späteren Forschungsaufenthaltes in Newcastle-upon-Tyne. Mein großer Dank gehört auch meiner Tutorin auf dem Gebiet der Myohistologie Frau Prof. Dr. Stoltenburg, die mich unermüdlich ermutigte, mich immer weiter in das Gebiet der Neuropathologie zu vertiefen. Anerkennen möchte ich das erfinderische Geschick von Dr.-Ing. Lehnich, das Hankraftmeßgerät zu entwickeln und am Leben zu erhalten. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Hellsten vom Muskelforschungszentrum in Kopenhagen, mit der ich meine erste wissenschaftliche internationale Kooperation durchführte. Für unsere gemeinsame Arbeit gewannen wir den Posterpreis der DGN 2004.

Ich möchte mich bedanken bei Herrn Liu, der sich im Rahmen seiner Masterarbeit mit dem Thema des Myoadenylatdesaminasemangels im

Muskellabor beschäftigte und bei Herrn Dr. rer. medic. Joshi, mit dem ich an mehreren Studien im Muskellabor der neurologischen Klinik zusammenarbeitete.

Ich danke meinen Doktorandinnen Frau Vetterke und Frau Richter, die funktionelle Untersuchungen mit dem Handkraftmessgerät mit neuen Fragestellungen weitergeführt haben.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen im Muskellabor der Klinik für Neurologie, Frau Zietz, Frau Scholz, Frau Wangemann, Frau Heinz und Frau Land für ihre Unterstützung bei meiner praktischen Tätigkeit im Muskellabor.

Ebenso gebührt den medizinisch-technischen Assistentinnen in der elektrophysiologischen Abteilung der Klinik für Neurologie, Frau Schmidt, Frau Tennert, Frau Winzig und Frau Berg mein Dank für die Durchführung der vielfältigen elektrophysiologischen Untersuchungen.

Ohne die Mitarbeiterinnen der Neuromuskulären Ambulanz Frau Christiane Holter, Frau Sabine Knöchel und Frau Dana Fricke wäre die Rekrutierung von Patienten nicht so erfolgreich verlaufen.

Frau Pabst und Frau Nickel aus dem Chefsekretariat der Klinik und Poliklinik für Neurologie bin ich für ihre großzügige Terminvergabe und manche Erheiterung im stressreichen Alltag zu Dank verpflichtet.

Großer Dank gebührt selbstverständlich auch den vielen Patienten, die keine Zeit und Mühe scheuten, um sich an den Studien zu beteiligen. Ohne ihre Bereitschaft und ihren Enthusiasmus wären viele meiner Studien nicht realisierbar gewesen.

Abschließend möchte ich dankend anerkennen, dass ohne das fortgesetzte Verständnis meiner Partnerin, Frau Ulrike Barth, eine wissenschaftliche Tätigkeit neben der klinischen Routine nicht auf diese entspannte Art möglich gewesen wäre. Mein sehr großer Dank gilt auch meinen Eltern, Maria und Gisbert Hanisch, die mich all die Jahre auf meinem gewundenen wissenschaftlichen Werdegang und meinen vielfältigen Auslandsaufenthalten unterstützt haben.