

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie der
Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. Stephan Zierz

Enzymaktivitäten der AMP-Deaminase und Adenylatkinase im Skelettmuskel
von Patienten der McArdle-Myopathie

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

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

von Thekla Apitz
geboren am 09.11.1984 in Köthen (Anhalt)

Gutachter/Gutachterin:

1. Prof. Dr. Stephan Zierz
2. Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte
3. Prof. Dr. Peter Young (Münster)

Eröffnungsdatum: 29.04.2014

Verteidigungsdatum: 22.09.2015

REFERAT

Die McArdle-Glykogenose ist gekennzeichnet durch die auf einem Phosphorylasemangel beruhende Unfähigkeit zur Aufspaltung des Glycogens im Skelettmuskel. Während körperlicher Betätigung setzt die Skelettmuskulatur der McArdle-Patienten kein oder nur wenig Laktat frei. Merkwürdigerweise kommt es dabei jedoch zu einem exzessiv hohen Ammoniakanstieg. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb die Aktivitäten der AMP-Deaminase (AMPD) und Adenylatkinase (AK), die die Reaktionen der Ammoniakproduktion katalysieren, bei 11 McArdle-Patienten untersucht werden. Ein AMPD-Mangel wird am häufigsten verursacht durch die Mutation p.Q12X im AMPD1-Gen. Daher wurden alle McArdle-Patienten und Kontrollen auf das Vorhandensein dieser Mutation untersucht.

Das Angiotensin-Converting-Enzym wird als Einflussfaktor auf die Symptomausprägung verschiedener Krankheiten diskutiert, so auch der McArdle-Glykogenose. Die 3 Genotypen DD, DI und II des ACE-Gens weisen eine Korrelation zu bestimmten Krankheitsmerkmalen der McArdle-Patienten auf, daher sollte der Einfluss dieses D/I-Polymorphismus auf die Aktivitäten der AMPD und AK, sowie der Housekeepingenzyme Phosphoglucoisomerase (PGI) und Citratsynthase (CS), untersucht werden.

Bei 2 McArdle-Patienten und 7 Kontrollen zeigte sich eine Heterozygotie CT des AMPD1-Gens. 9 Patienten und 20 Kontrollen wiesen den Wildtyp (CC) auf. Sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe lagen die AMPD-Aktivitäten des Wildtyps signifikant über denen der Heterozygoten. Es gab keinen signifikanten Unterschied der AMPD-Aktivitäten zwischen Patienten und Kontrollen. Ebenso wenig wichen die AK-Aktivitäten der Patienten signifikant ab von denen der Kontrollen. Die Aktivitäten sowohl des glykolytischen Enzyms PGI als auch der CS lagen bei den Patienten statistisch signifikant höher. Bezogen auf den ACE-Gen-Polymorphismus wiesen die 8 Patienten des Genotyps DI signifikant höhere Enzymaktivitäten der PGI auf als die 3 Patienten des Genotyps DD.

Zusammenfassend scheint die hohe Ammoniakproduktion bei McArdle-Patienten nicht auf einer Enzyminduktion der AMPD zu beruhen. Mögliche alternative Erklärungen umfassen neben einer höheren Substratverfügbarkeit veränderte enzymkinetische Eigenschaften, wie die Substrataffinität, oder alternative Produktionsvorgänge.

Gleichwohl wurde gezeigt, dass eine Induktion der PGI und der CS bei McArdle-Patienten vorliegt, was die Hypothese adaptiver Vorgänge bei der Glykogenose McArdle unterstützt. Womöglich beruht die in anderen Arbeiten beobachtete Symptomabschwächung bei den McArdle-Patienten, die ein Insertions-Allel im ACE-Gen aufweisen, auf einer gesteigerten Expression des glykolytischen Enzyms PGI.

Apitz, Thekla: Enzymaktivitäten der AMP-Deaminase und Adenylatkinase im Skelettmuskel bei Patienten der McArdle-Myopathie. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 72 Seiten, 2013

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	7
1.1.	Der Energiestoffwechsel des Muskels	7
1.1.1.	Der Purinnukleotidzyklus (PNZ)	8
1.2.	Mechanismen der Enzymregulierung	10
1.3.	Die McArdle-Myopathie	11
1.3.1.	Krankheitsmerkmale	12
1.3.2.	McArdle-Phänotyp und ACE-Gen-Polymorphismus	13
1.3.3.	Diagnostik der Glycogenose Typ V	14
1.3.4.	Pathophysiologische Grundlagen	16
1.3.5.	Therapiemöglichkeiten	17
1.4.	Die Enzyme AMPD und AK	18
1.4.1.	Die Adenosinmonophosphatdeaminase (AMPD)	18
1.4.2.	Der Myoadenylatdeaminasemangel (MADD)	19
1.4.3.	Die Adenylatkinase (AK)	20
1.4.4.	Der Adenylatkinasemangel	22
1.5.	Die Housekeeping-Enzyme CS und PGI	22
2.	ZIELSTELLUNG	23
3.	PATIENTEN	24
3.1.	Patienten und Kontrollen	24
3.2.	Muskelbiopsien	25
4.	MATERIAL UND METHODEN	26
4.1.	Reagenzien	26
4.2.	Geräte	26
4.3.	Molekulargenetische Methoden	27
4.3.1.	Das AMPD1-Gen	27
4.3.2.	Der Mutationsnachweis	28
4.3.3.	Das ACE-Gen	29
4.3.4.	Der Deletionsnachweis	30
4.4.	Biochemische Methoden	31
4.4.1.	Aufarbeitung der Muskelproben	31
4.4.2.	Spektralphotometrische Messungen	31
4.4.3.	Die AMP-Deaminase (AMPD)	31
4.4.4.	Die Adenylatkinase (AK)	32
4.4.5.	Die Phosphoglucoisomerase (PGI)	33

INHALTSVERZEICHNIS

4.4.6.	Die Citratsynthase (CS)	34
4.4.7.	Quantifizierung des nichtkollagenen Proteins	35
4.5.	Statistik	35
5.	ERGEBNISSE	36
5.1.	Das Metabolitverhalten (Laktat und Ammoniak) im Laktatischämietest	36
5.2.	Molekulargenetische Ergebnisse	37
5.2.1.	Die AMPD1-Genotypen	37
5.2.2.	Ammoniakanstiege nach AMPD1-Genotyp	37
5.2.3.	Der ACE-Gen-Polymorphismus	38
5.3.	Biochemische Ergebnisse	39
5.3.1.	Die AMP-Deaminase	39
5.3.2.	Die Adenylatkinase	40
5.3.3.	Die Housekeepingenzyme Citratsynthase und Phosphoglucoisomerase	41
5.3.4.	Bezugnahme der AMPD und AK auf die Housekeepingenzyme	41
5.3.5.	Einflussnahme des D/I-Polymorphismus auf die Enzymaktivitäten bei McArdle	43
6.	DISKUSSION	45
6.1.	Der Laktatischämietest	45
6.2.	Molekulargenetik	45
6.2.1.	Häufigkeitsverteilung des AMPD1-Genotyps	45
6.2.2.	Ammoniakanstiege nach AMPD-Genotyp	46
6.2.3.	Der D/I-Polymorphismus der McArdle-Patienten	47
6.3.	Biochemie	47
6.3.1.	Die AMP-Deaminase	47
6.3.2.	Die Adenylatkinase	50
6.3.3.	Die Housekeepingenzyme Phosphoglucoisomerase und Citratsynthase	50
6.3.4.	Bezugnahme der AMPD und AK auf die Housekeepingenzyme	51
6.3.5.	Erklärungsansätze für die hohe NH ₃ -Produktion bei McArdle	52
6.3.6.	Einflussnahme des D/I-Polymorphismus auf die Enzymaktivitäten bei McArdle	54
6.4.	Schlussfolgerung	54
7.	ZUSAMMENFASSUNG	57
8.	LITERATURVERZEICHNIS	59
9.	TABELLENANHANG	69
10.	THESEN	72

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A	(Enzym-)Aktivität; auch: Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
ACE	Angiotensin-converting-enzyme
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AK	Adenylatkinase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPD	Adenosinmonophosphatdeaminase
AMPD1	Gen, kodiert für die AMP-Deaminase
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid assay
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin = Rinderalbumin
c	Konzentration
C	Cytosin
Ca ²⁺	Calcium
c.C34T	Mutation für den AMP-Deaminasemangel, s. auch p.Q12X
CK	Creatinkinase
cm	Centimeter
CrP	Creatinphosphat
CS	Citratsynthase
Cu	Kupfer
d	(Schicht)dicke
Δ Ammoniak	Ammoniakdifferenz (delta Ammoniak)
Δ Extinktion	Extinktionsänderung
ΔE/min	Extinktionsänderung pro Minute
dNTP	Desoxy-Ribonukleotidtriphosphat
DTNB	Dithiobenzoesäure
ε	molarer Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ /cm]
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

F	Verdünnungsfaktor des Homogenats
Fa.	Firma
FG	Feuchtgewicht
Fructose-6-P	Fructose-6-Phosphat
G	Guanin
g	Gramm
G6P-DH	Glucose6-Phosphat-Dehydrogenase
Ges.	Gesamt
Glutamat-DH	Glutamat-Dehydrogenase
Gly-Gly	Glycyl-Glycyl
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ⁺	Proton
HCl	Chlorwasserstoff
HK	Hexokinase
IMP	Inosinmonophosphat
K ⁺	Kalium
k_2	spezifische katalytische Enzymkapazität
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
KOH	Kaliumhydroxid
KCl	Kaliumchlorid
λ	Wellenlänge
LIT	Laktatschämietest
M	Mol, molar
MAD	Myoadenylatdeaminase
MADD	Myoadenylatdeaminasemangel
MAK	Myoadenylatkinase
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	Millimol, millimolar
mRNA	messenger RNA
Musc.	Musculus
l	Liter
Na ⁺	Natrium

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

NADP	Nicotinamidadeninindinukleotidphosphat
NADPH	reduzierte Form des NADP
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₃	Ammoniak
NCP	nichtkollagenes Protein
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
PFK	Phosphofructokinase
PGI	Phosphoglucoisomerase
31-P-MRS	31P-Magnetresonanzspektroskopie
PNZ	Purinnukleotidzyklus
PYGM-Gen	Gen, welches für die Phosphorylase kodiert
p.Q12X	häufigste Mutation des AMPD1-Gens
s	Sekunde
S.cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
Signifik.	Signifikanz
TAE	Tris/Aceticacid/EDTA
TBE	Tris/Boric/EDTA
TEMED	Tetraethylmethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TT	Genotyp, homozygot für die c.C34T-Mutation
T	Thymin
U	Units (Enzymeinheit)
U/g FG	Units pro Gramm Feuchtgewicht
U/g NCP	Units pro Gramm nichtkollagenem Protein
UV	ultraviolett
V	Volt
V. cubitalis	Vena cubitalis
VO ₂ max	maximale Sauerstoffaufnahme
Vol	Volumen
Vol _{Küvette}	Messvolumen der Küvette [μl]
Vol _p	Probenvolumen des Homogenats [μl]
vs.	versus

1. Einleitung

1.1. Der Energiestoffwechsel des Muskels

In Ruhephasen gewinnt der Muskel seine Energie hauptsächlich durch die Oxidation von Glucose aus dem Blut (Resorptionsphase) und Fettsäuren (Postresorptionsphase). Bei schnell einsetzender, starker Belastung wird Energie aus den Glycogenspeichern gewonnen - zu Beginn der muskulären Arbeit auch durch die anaerobe Glycolyse, deren Endprodukt das Laktat ist. Bei anhaltender Belastung dienen wiederum die aus der Lipolyse gewonnenen Fettsäuren der Deckung des Energiebedarfs.

Das Äquivalent der aus dem Abbau energiereicher Substrate gewonnenen Energie ist das ATP, welches eine der Grundvoraussetzung aller vitalen Stoffwechsellvorgänge ist, miteingeschlossen der neuronalen Erregungen, des aktiven Stofftransports, der Zellproliferation und der Muskelkontraktion. Das in der Glycolyse, dem Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung gewonnene ATP kann mit Creatin zu Creatinphosphat (CrP) reagieren und die Energie so gespeichert werden. Katalysiert wird diese Reaktion an der äußeren Mitochondrienmembran durch die Creatinkinase (CK):



Das im CrP enthaltene energiereiche Phosphat kann an die Myofibrillen transportiert und dort durch die Umkehrreaktion mit Hilfe der an die kontraktile Proteine gebundenen CK wieder zur ATP-Synthetisierung genutzt werden. Diese Aufspaltung des CrP wird begünstigt durch hohe Konzentrationen an ADP und Protonen (Sahlin et al., 1990). Das ATP dient der aktomyosin gebundenen ATPase als Reaktions- und damit der durch die Bewegung der Myofilamente verursachten Muskelkontraktion als Energiesubstrat.

Solange ein genügend großer Vorrat an CrP vorhanden ist, akkumuliert ADP als Produkt der ATP-Hydrolyse nicht. Hält die Produktion des als Puffers wirkenden CrP jedoch nicht Schritt mit dessen Verbrauch, beginnt ab einem Abfall des CrP-Spiegels um mehr als 50 % auch der ATP-Gehalt der Muskelzelle abzunehmen (Sabina et al., 1984).

Das bei der Hydrolyse des ATP entstehende ADP dient der Adenylatkinase (AK) im Muskel als Substrat zur alternativen Produktion von ATP:



1 EINLEITUNG

AMP, welches durch die Adenylatkinasereaktion entsteht, wird abgebaut durch die Adenosinmonophosphatdeaminase (AMPD), die das Gleichgewicht der AK-Reaktion zu Gunsten der ATP-Entstehung verschiebt und eine ADP-Akkumulation verhindert (Sabina et al., 1984; Hancock et al., 2005).



Die Reaktion der AMPD ist die Hauptquelle der Entstehung von Ammoniak im Muskel (Meyer und Terjung, 1979; Lowenstein, 1990) und verhindert eine Akkumulation von AMP. Der zu den sinkenden Purinnukleotidspiegeln stöchiometrische Anstieg von IMP und Ammoniak im Muskel während muskulärer Arbeit ist somit auf die Hydrolysierung von AMP durch die AMPD zurückzuführen (Meyer und Terjung, 1979; Norman et al., 2001).

Im Skelettmuskel existieren 3 Fasertypen, die nach den Kriterien Kontraktionskraft und Enzymgehalt eingeteilt werden: die Typ I-Fasern sind charakterisiert durch eine niedrigere glykolytische und höhere oxidative Kapazität; die Typ IIb-Fasern sind dem entgegengesetzt ausgestattet. Eine Zwischenstellung nehmen die Typ IIa-Fasern ein (Meyer und Terjung, 1979). Glucose ist Hauptenergielieferant der glykolytischen Fasern, während der ATP-Bedarf der oxidativen Muskelfasern zu 70 % aus dem Abbau von Fettsäuren gedeckt wird (Huber et al., 2007). Daher sind die größten Glycogenvorräte in Typ II-Muskelfasern vorhanden, die die höchste Expression des Glucosetransporters GLUT4 aufweisen (Huber et al., 2007). Der unterschiedliche Fasergehalt in den verschiedenen Muskeln kennzeichnet deren Kontraktionsverhalten: Der hauptsächlich aus Typ II-Fasern bestehende *Musc. gastrocnemius* beispielsweise führt schnelle Kontraktionen aus, während der *Musc. soleus* ein eher langsam kontrahierender Muskel ist, der während isometrischer Kontraktionen einen geringeren ATP- und CrP-Verbrauch aufweist (Meyer und Terjung, 1979). In einem Tierexperiment, in dem die unterschiedlichen Muskeltypen untersucht wurden, wiesen Terjung und Meyer (1979) einen signifikant höheren Anstieg der Metabolite Laktat, IMP und Ammoniak während elektrischer Stimulationen im *Musc. gastrocnemius* nach - ein Zeichen für die höhere Aktivität glykolytischer Enzyme und der AMPD, verglichen mit vornehmlich aus Typ I-Fasern bestehenden Muskeln.

1.1.1. Der Purinnukleotidzyklus (PNZ)

3 Reaktionen bilden den Purinnukleotidzyklus, der in Abbildung 1 dargestellt ist. Da die Reaktion der AMPD irreversibel ist, wird durch diesen Kreislauf IMP rückkonvertiert zu AMP,

1 EINLEITUNG

dessen Abbau zu Adenosin (und anschließende Deaminierung) damit verhindert wird. Diese letztgenannten Reaktionen, katalysiert durch die dephosphorylierende 5'-Nukleotidase und die deaminierende Adenosindeaminase, stellen den alternativen Abbauweg des AMP dar.

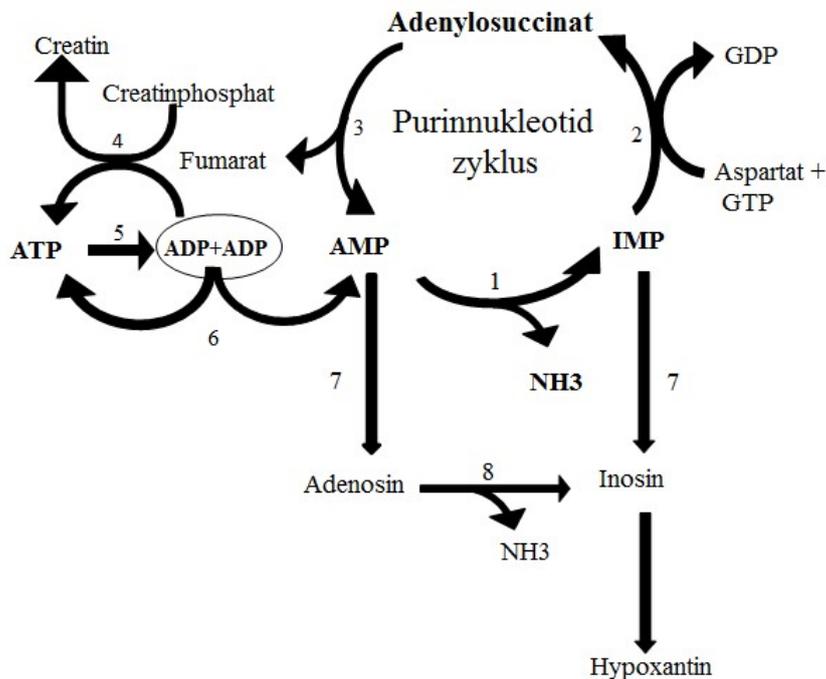


Abb. 1: Der Purinnukleotidzyklus, nach Gross (1997). Reaktionen 1-3 stellen den eigentlichen Zyklus dar, in dem AMP zu NH_3 und IMP abgebaut wird. Letzteres wird über Adenylosuccinat über die Integration der Aminosäure Aspartat wieder rückkonvertiert zu AMP. 1=AMPD; 2=Adenylosuccinatsynthetase; 3=Adenylosuccinatlyase. Das durch die actomyosin gebundene ATP-ase (5) verbrauchte ATP wird wiedergewonnen durch die Creatinkinase (4) und durch die Reaktion der AK (6). AMP und IMP werden in kleinerem Umfang durch die 5'-Nukleotidase (7) zu Adenosin und Inosin abgebaut. Auch bei dem Abbau des Adenosins zu Inosin über die Adenosindeaminase (8) entsteht NH_3 .

Dem PNZ werden die im Folgenden aufgeführten Funktionen beigemessen. Die Wichtigste ist dabei sicherlich

- die Beeinflussung der Konzentrationen der Nukleotide, welche wesentlich an der Steuerung verschiedener Stoffwechselfvorgänge und Enzyme der Zelle beteiligt sind. So findet über die Reaktion der AMPD (3)
 - die Verschiebung des Gleichgewichts der AK (2) zu Gunsten der ATP-Entstehung statt. Der Eintritt der Aminogruppe in den PNZ über das Substrat Aspartat bietet eine
 - Möglichkeit zur Deaminierung verschiedener Aminosäuren zur Energiegewinnung und das durch die Deaminierung des AMP frei werdende Ammoniak kann
 - der Regulierung des pH-Werts

1 EINLEITUNG

dienen, der im anaeroben Stoffwechsel durch die Entstehung von Laktat absinkt. Eine weitere Hypothese der Funktion des gebildeten Ammoniaks ist

- die Aktivierung des Enzyms Phosphofruktokinase (PFK) (Sugden et al., 1975) als unmittelbarer Enzymaktivator und auf indirektem Weg über die oben genannte, den pH-Wert beeinflussende Eigenschaft (Meyer und Terjung, 1979). Letztere Theorie - die unmittelbare Beeinflussung der Glycolyse durch den anfallenden Ammoniak - wird gestützt durch die Beobachtung einer positiven Korrelation zwischen den Aktivitäten der AMPD und der PFK (Lowenstein, 1990). Katz et al. (1986) konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen NH_3 - und Laktatproduktion feststellen und vermuteten daher, Ammoniak spiele keine Rolle in der PFK-Aktivierung. Zudem würde die Menge an gebildetem NH_3 für die Neutralisierung von lediglich 3% der während der Glycolyse gebildeten Protonen ausreichen und sei damit nicht ausreichend, um das gebildete Laktat zu neutralisieren.

Das während der Adenylosuccinasereaktion gebildete Fumarat ist ein Substrat im energieliefernden Citratzyklus. Lowenstein beschrieb in seiner zusammenfassenden Arbeit über die Funktionen des PNZ (1990) ein Experiment, in dem die sich während muskulärer Arbeit vervierfachenden Anstiege der Citratzyklusintermediate Fumarat und Malat durch die Hemmung eines Schenkels des PNZ merklich reduziert wurden und schloss daraus, dass das im PNZ gebildete Fumarat der Steigerung der Energiegewinnung im Citratzyklus dienen könnte. Besonders

- diese anaplerotische Funktion des PNZ wird in der Literatur lebhaft diskutiert (Meyer und Terjung, 1979; Lowenstein, 1990; Tarnopolsky, 2001). Tarnopolsky (2001) beispielsweise stellte demgegenüber bei der Untersuchung von nach Muskelarbeit entnommenen Proben keinen Unterschied in den Konzentrationen der Citratzyklusintermediate zwischen Kontrollen und Patienten mit einem Mangel an AMPD, dem Schlüsselenzym des PNZ, fest und schloss daher auf die Unbedeutsamkeit des PNZ in der Anaplerose des Citratzyklus.

1.2. Mechanismen der Enzymregulation

Zur Aufrechterhaltung aller Stoffwechselfvorgänge, so auch des Energiehaushalts der Skelettmuskulatur, werden Enzyme benötigt. Die Geschwindigkeit der durch die Enzyme katalysierten Reaktionen hängt im Wesentlichen von 4 voneinander unabhängigen Parametern ab:

- (1) von der Substratkonzentration $[S]$
- (2) von der Enzymaffinität, ausgedrückt durch K_M
- (3) von der katalytischen Aktivität des Enzyms k_2 und

1 EINLEITUNG

(4) von der Enzymkonzentration, welche durch Induktion und Repression gesteuert wird.

(1) Die Geschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion kann, je nach Art des Enzyms, als hyperbole oder sigmoide Funktion der Substratkonzentration dargestellt werden. Mit steigender Substratkonzentration $[S]$ nimmt die Sättigung und damit die effektive Reaktionsgeschwindigkeit zu. Das gilt für Bereiche, in denen das Enzym nicht vollständig gesättigt ist oder, anders ausgedrückt, die Substratkonzentration deutlich unter der Michaelis-Menten-Konstante K_M liegt. K_M entspricht der Substratkonzentration, bei der die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist.

(2) Ein weiterer wichtiger Mechanismus der Enzymregulation ist die Veränderung der Affinität zum Substrat, das heißt die Veränderung von K_M . Demnach ändert sich also der Wert der Substratkonzentration, bei der die halbe Maximalgeschwindigkeit erreicht wird. Dies kann durch kompetitive oder allosterische Hemmung (respektive Aktivierung) geschehen. Zudem ist K_M abhängig vom jeweiligen Substrat und den Umgebungsbedingungen wie pH-Wert und Temperatur.

(3) Die enzyspezifische kinetische Konstante k_2 bezeichnet die Anzahl von Substratmolekülen, welche bei vollständiger Sättigung des Enzyms pro Zeiteinheit in das Produkt umgewandelt werden. Sie kann auch als katalytische Kapazität eines Enzyms bezeichnet werden. In seltenen Fällen kann diese durch allosterische Effektoren geändert werden; es ändert sich dann nicht die Substratbindung K_M , sondern die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion.

(4) Ist Substrat im Überschuss vorhanden, wird die Maximalgeschwindigkeit der katalysierten Reaktion erreicht, welche dann allein abhängig ist von der Enzymkonzentration. Eine Erhöhung der Enzymkonzentration wird erreicht durch die genetisch kontrollierte Steigerung der Proteinsynthese oder eine Hemmung des Abbaus (Proteolyse). Dies wird als Induktion bezeichnet. Das Gegenteil entspricht der Repression. Verschiedene Adaptationsvorgänge des Organismus entsprechen diesem Regulationsmechanismus.

1.3. Die McArdle-Myopathie

Der Name dieser Erkrankung benennt den Erstbeschreiber: McArdle stellte 1951 die belastungsabhängigen Beschwerden eines 30-jährigen Mannes dar und schloss aus der Tatsache, dass der Patient keinerlei Anstieg des venösen Laktats nach anaerober Muskelarbeit aufwies, darauf, dass die Ursache der dargebotenen Symptome im Glucosestoffwechsel zu suchen ist.

1 EINLEITUNG

Die McArdle-Erkrankung, auch Glycogenose Typ V genannt, ist eine Glycogen-Stoffwechselerkrankung. Sie ist unter den kohlenhydratstoffwechselassoziierten Myopathien die häufigste. Patienten, die an dieser Erkrankung leiden, haben einen Mangel an der muskulären Isoform des Enzyms Phosphorylase, welche in Situationen des Energiebedarfs im Muskel die 1,4-glycosidischen Bindungen des Glycogens spaltet und freie Glucose-1-Phosphat dem glycolytischen Abbau zugänglich macht (Miteff et al., 2011). Der Myophosphorylasemangel macht sich demnach besonders bemerkbar in Situationen, in denen der Muskel auf die Energiegewinnung aus seinen Glycogenvorräten angewiesen ist, also während plötzlich einsetzender, starker motorischer Belastung.

1.3.1. Krankheitsmerkmale

Fast ausschließlich alle Patienten leiden an einer mangelnden Toleranz gegenüber stärkerer körperlicher Belastung (Miteff et al., 2011). Diese drückt sich in Muskelkrämpfen, reversiblen Kontrakturen und vorzeitiger muskulärer Ermüdbarkeit aus, die die Patienten zum Abbruch der ausgeübten körperlichen Kraftanstrengung zwingt. Die Beschwerden bestehen meist schon seit der Kindheit, können aber auch erst im Erwachsenenalter auftreten (Lucia et al., 2008). Bei den Patienten bestehen durchweg erhöhte CK-Serumspiegel. Besonders isometrische Kraftübungen, die aufgrund des hohen Druckaufbaus die Blutzufuhr des Muskels drastisch reduzieren, können zu sogenannten muskulären Krisen führen, die durch massive CK-Erhöhungen gekennzeichnet sind und im schlimmsten Fall in Rhabdomyolysen und Myoglobinurien resultieren. Diese können zum Nierenversagen führen (Lucia et al., 2008; Quinlivan et al., 2010). Bei 20 bis 30 % der Patienten kommt es zu einer fixierten Muskelschwäche bis hin zu Atrophien (Argov et al., 1987; Martinuzzi et al., 2003). Bei einigen Patienten ist das Auftreten einer Hyperurikämie und Gichtkrankheit beschrieben worden (Mineo et al., 1987).

Mangelnde Belastbarkeit, Myalgien und Muskelschwäche sind Symptome vieler neuromuskulärer Erkrankungen. Ein besonderes Merkmal, welches die McArdle-Myopathie jedoch von anderen, den Energiehaushalt des Muskels beeinträchtigenden Krankheiten unterscheidet, ist das sogenannte „Second wind“-Phänomen. Dieser Begriff bezeichnet das Eintreten einer Besserung der Beschwerden nach 7- bis 10-minütiger dynamischer Bewegung, die sich sowohl in subjektiver Erleichterung der anfänglichen Schmerzen und der muskulären Ermüdung als auch in einer Verbesserung der ebenfalls für McArdle-Patienten typischen Tachykardie und Atemnot ausdrückt (Lucia et al., 2008). Die ursprünglich angenommene Genese des „Second wind“-Phänomens lag in dem verzögerten Einsetzen des intrazellulären oxidativen Stoffwechsels begründet, der für die Beschwerdeabnahme der Patienten verantwortlich sei (Braakhekke et al., 1986). Nach jüngerer Hypothese ist das pathophysiologische Korrelat des „Second wind“ die einsetzende Versorgung des Muskels mit energiereichen Substraten, hauptsächlich Glucose, aus der Blutbahn. Die dadurch gesteigerte

1 EINLEITUNG

Substratverfügbarkeit kompensiert zum Teil die maßgeblich beeinträchtigte Glycogenolyse (Vissing und Haller, 2003). Die Abhängigkeit vom Blutzucker drückt sich in einer verschlechterten Muskelfunktion nach Fastenperioden aus (Lucia et al., 2008).

Bei McArdle-Patienten existiert nicht nur ein Defekt des anaeroben Stoffwechsels, der sich in der anfangs erwähnten Abwesenheit steigender Laktatspiegel während anaerober Muskelarbeit bemerkbar macht. Auch die oxidative Kapazität ist verringert, was der fehlenden Pyruvatproduktion geschuldet ist (Haller und Vissing, 2002; Haller et al., 2006; Lucia et al., 2008). Dementsprechend werden neben den muskulären Beschwerden ein übersteigertes kardiovaskuläres Antwortverhalten sowie eine verringerte maximale O₂-Aufnahme bei Patienten der Glykogenspeicherkrankheit beobachtet (Lewis und Haller, 1986; Martinuzzi et al., 2003; Lucia et al., 2008).

Während Miteff et al. (2011) in der Beschreibung von 10 McArdle-Patienten in Bezug auf den Krankheitsbeginn und die dargestellten Symptome große Übereinstimmungen feststellten, unterstrichen demgegenüber andere Autoren häufig die große Varianz der Merkmalsausprägung bei Glycogenose Typ V-Patienten (Martinuzzi et al., 2003; Paradas et al., 2005; Rubio et al., 2007; Lucia et al., 2008). Einige Patienten werden kaum symptomatisch (Martinuzzi et al., 2003), während andere bei jeder Bewegung auftretende Schmerzen und Krämpfe beklagen, die im Extremfall das Kauen eines Kaugummis und das Zähneputzen erschweren (Lucia et al., 2008). Unter anderem hat die Tatsache, dass diese Heterogenität der Symptomausprägung auch unter verwandten McArdle-Patienten auftritt, zu umfangreicher Ursachenforschung geführt (Martinuzzi et al., 2003; Paradas et al., 2005; Rubio et al., 2007). Gründe der klinischen Heterogenität werden gesehen in unterschiedlichem diätetischen Verhalten, dem Lebensstil, dem Geschlecht und in der Koexistenz weiterer genetischer Abweichungen (Rubio et al., 2007; Lucia et al., 2008). Auf letztere Möglichkeit soll in dieser Arbeit eingegangen werden.

1.3.2. McArdle-Phänotyp und ACE-Gen-Polymorphismus

Die phänotypische Ausprägung der Glycogenspeicherkrankheit variiert erheblich unter den Betroffenen (Martinuzzi et al., 2003; Paradas et al., 2005; Rubio et al., 2007; Lucia et al., 2008). Gründe dafür werden unter anderem in den Unterschieden im Genotyp der Patienten gesucht. An dieser Stelle soll kurz in die Problematik des ACE-Gens eingeführt werden.

In der Diagnostik der granulomatösen Systemerkrankung Sarkoidose wird das ACE schon länger genutzt (Lieberman, 1975). Indem es Angiotensin I in das aktive Angiotensin II konvertiert und das vasodilatatorische Bradykinin abbaut, besitzt ACE eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel der vasoaktiven Peptide (Hubert et al., 1991).

Dass die interindividuellen Unterschiede des Enzymspiegels mit dem Vorhandensein (Insertion) bzw. der Abwesenheit (Deletion) einer 287 bp-Sequenz im Intron 16 des ACE-Gens zusammenhängen, ist seit den Arbeiten von Rigat et al. (1990) und Hubert et al. (1991) bekannt.

1 EINLEITUNG

Die Korrelation des Serumspiegels mit anderen Erkrankungen wird in jüngerer Zeit viel diskutiert. Das Allelmuster DD, welches mit den höchsten Enzymspiegeln im Serum assoziiert ist, wird als Risikofaktor für Herzinfarkte (Cambien et al., 1992), hypertrophe Kardiomyopathie und den plötzlichen Herztod beschrieben (Marian et al., 1993). Williams et al. (2000) beschrieben einen signifikant verbesserten Trainingseffekt auf die Arbeitsleistung von Individuen des mit den niedrigsten ACE-Spiegeln verbundenen Genotyps II.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben den Effekt der Konstellation des ACE-Gens auf die phänotypische Krankheitsausprägung bei McArdle-Patienten untersucht (Martinuzzi et al., 2003; Rubio et al., 2007, Gómez-Gallego et al., 2008).

Martinuzzi (2003) und Rubio (2007) und deren Mitarbeiter stellten eine Beeinflussung des ACE-Polymorphismus auf die Ausprägung der Symptome fest, die mit Hilfe eines Fragebogens erhoben wurden: Die I-Allel-Frequenz war am geringsten in der Gruppe der Patienten mit den ausgeprägtesten Symptomen. Gómez-Gallego et al. (2008) eruierten, dass bei weiblichen McArdle-Patienten das I-Allel einen positiven Einfluss auf die Körperfunktion nimmt, gemessen an der Größe $VO_2\text{max}$.

Paradas et al. (2005) stellten demgegenüber wiederum keine Beeinflussung der Krankheitsmerkmale durch den ACE-Gen-Polymorphismus fest, gemessen an verschiedenen Parametern wie EMG-Muster, Ergebnisse im Laktatishämietest und Phosphorylaseaktivitäten. Die angenommenen Gründe für diese mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation werden gesehen in einer lokalen Gefäßerweiterung durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid (Williams et al., 2000), in der verbesserten Glucose-Aufnahme durch Muskelzellen und einer Adaptation glykolytischer Enzyme (Gómez-Gallego et al., 2008).

1.3.3. Diagnostik der Glycogenose Typ V

Der Laktatishämietest

Ein etabliertes Instrument zur Diagnostik von Defekten im Glucosestoffwechsel ist der Laktatishämietest (LIT), der von Brian McArdle entwickelt wurde (Lucia et al., 2008). Während dieses Tests wird in den Armmuskeln des Untersuchten ein ischämischer Zustand durch Anlegen einer Blutdruckmanschette mit Druckwerten über dem systolischen Blutdruck hervorgerufen. Nach einminütigen maximalen Handkontraktionen wird die Manschette gelöst. Es folgen Blutentnahmen aus der V. cubitalis 1, 3, 5 und 10 min nach Beginn der 60-sekündigen Kontraktionen. Aus dem venösen Blut werden Ammoniak und Laktat bestimmt. Die Werte werden mit dem aus zuvor entnommenem Blut bestimmten Ruhespiegel verglichen.

Ein zu geringer Laktatanstieg weist auf einen Enzymdefekt in der Glycogenolyse oder Glycolyse hin; ein zu geringer Ammoniakanstieg auf einen AMPD-Mangel.

Nachteile des Tests sind möglicherweise auftretende Schmerzen. Lindner et al. beschrieben 2001 ein bei einem Patienten nach durchgeführtem LIT aufgetretenes Kompartmentsyndrom.

1 EINLEITUNG

Diese „Nebenwirkung“ hatte zur Entwicklung eines Tests geführt, der ohne das Abbinden der Blutzufuhr durchgeführt werden kann.

Des Weiteren kann es bei unzureichender Mitarbeit oder stark ausgeprägter motorischer Schwäche des Patienten zu falsch positiven Testergebnissen kommen. Auch schließt ein geringer Laktatanstieg eine Glycogenose Typ V nicht aus, da in einigen Fällen Restaktivitäten der Phosphorylase vorhanden sind.

Ein besonderes Merkmal ist der dieser Arbeit zugrunde liegende und häufig beschriebene überhöhte Ammoniakanstieg nach motorischer Belastung bei McArdle-Patienten (Rumpf et al., 1981; Kono et al., 1984; Mineo et al., 1985, 1987; Coleman et al., 1986; Sinkeler et al., 1986 a; Kazemi-Esfarjani, 2002; Gómez-Gallego et al., 2008). Die Abbildung 2 ist der Arbeit von Rumpf et al. (1981) entnommen und stellt dieses Merkmal am Beispiel eines McArdle-Patienten bildlich dar. Ebenso wird von systemisch erhöhten Inosin-, Hypoxanthin- und Harnsäureserumspiegeln nach Durchführung anaerober Muskelarbeit berichtet (Mineo et al., 1987).

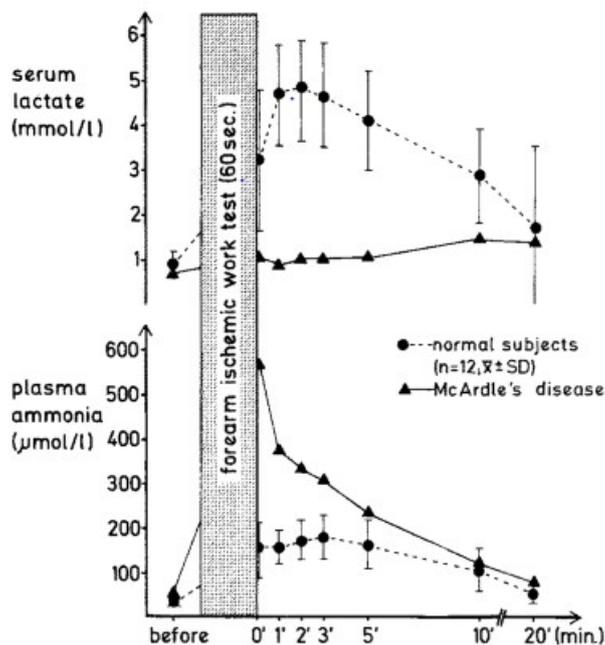


Abb. 2: Laktat- und Ammoniakkonzentrationen im Blut eines McArdle-Patienten im Vergleich mit 12 Kontrollpersonen nach der Durchführung eines LIT.

Quelle: Rumpf et al. (1981), *klin. Wochenschrift*.

Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlages.

Histologie

Histologisch sind in phosphorylasedefizienten Muskelbiopsien subsarcolemmale oder intermyofibrillare Glycogenanreicherungen sichtbar. Die Muskelproben zeigen negative histochemische Reaktionen für die Myophosphorylase.

Biochemie

Die biochemische Untersuchung der Muskelbiopsie enthüllt meist eine Phosphorylaseaktivität, die nahezu null ist. Es können geringe Restaktivitäten vorhanden sein (Lucia et al., 2008).

Die genetische Untersuchung fokussiert bei der Diagnostik hinsichtlich einer möglichen McArdle-Myopathie das PYGM-Gen, welches für die Myophosphorylase codiert (Martinuzzi et al., 2003). Da das Vererbungsmuster autosomal rezessiv ist (Deschauer et al., 2007; Lucia et al., 2008), muss in beiden Allelen eine Mutation vorliegen, um die krankheitstypischen Beschwerden auszulösen. Die häufigste Mutation, die in über 50% der europäischen McArdle-Patienten gefunden wird, ist die Mutation p.R50X im Exon 1 des PYGM-Gens (Martín et al., 2001; Deschauer et al., 2007). Es wurden bereits über 100 Mutationen dieses Gens detektiert (Quinlivan et al., 2010). Bei der Untersuchung der Genotyp – Phänotyp-Korrelation konnte keine signifikante Beeinflussung der klinischen Merkmale durch eine bestimmte Mutation festgestellt werden (Martín et al., 2001; Paradas et al., 2005; Deschauer et al., 2007).

1.3.4. Pathophysiologische Grundlagen

Die pathophysiologischen Grundlagen der McArdle-Erkrankung und ihrer Symptome sind komplex und noch nicht vollständig geklärt (Lucia et al., 2008). Während Löfberg et al. (2001) nach (aerober) Muskelarbeit im Vergleich zu Kontrollen keinen größeren Abfall des energiereichen Creatinphosphats bei McArdle-Patienten feststellen konnten, ist dieser jedoch von anderen Autoren (Lewis et al., 1985; Sahlin et al., 1990, 1995; Zange et al., 2003) beschrieben worden.

Sahlin und Mitarbeiter (1990) stellten zudem geringere NADH-Anstiege bei Glycogenose Typ V-Patienten nach Durchführung von Fahrradbelastungstests fest und deuteten diese als Beeinträchtigung der Citratzyklusfunktion.

Neben der offensichtlichen Beeinträchtigung der anaeroben Glycolyse existiert demnach eine in der Literatur vertretene Hypothese, die die mit motorischer Belastung einsetzenden Beschwerden der Patienten und die verringerte Arbeitsleistung (Löfberg et al., 2001) auf den gestörten oxidativen Abbau der Glykogenvorräte zurückführt (Sahlin et al., 1990; De Stefano et al., 1996; Haller und Vissing, 2002; Martinuzzi et al., 2003). Die Annahme, die ungenügende Zufuhr oxidativer Brennstoffe münde in einer insuffizienten ADP-Phosphorylierungsrate (Lewis und Haller, 1986) und transienten ADP-Akkumulation (Sahlin et al., 1990), wurde unterstützt durch magnetresonanzspektroskopische Untersuchungen (Radda, 1986; De Stefano

1 EINLEITUNG

et al., 1996), die höhere Anstiege an ADP nach anaerober Muskelarbeit und eine, am Verhalten des ADP-Abfalls gemessene, langsamere Erholungsphase bei McArdle Patienten nachgewiesen haben.

Um 50 - 75% reduzierte VO_2 max-Werte bei McArdle-Patienten werden als Ausdruck der geringeren Sauerstoffverwertbarkeit während muskulärer Arbeit angesehen (Lewis und Haller, 1986; Haller und Vissing; 2002). Die Sauerstoffverwertung - Indikator des oxidativen Stoffwechsels - verbesserte sich sowohl während des bereits beschriebenen „Second wind“-Phänomens als auch nach intravenöser Gabe von Glucose - einer künstlichen „Second wind“-Imitation. Haller und Vissing (2002) sehen in diesen Experimenten den Beweis dafür, dass das klinische Merkmal des „Second wind“ das Resultat eines durch mangelhafte Glucosenuztzung limitierten oxidativen Metabolismus ist. Da der Beginn muskulärer Arbeit bei McArdle-Patienten geprägt ist von einem defizitären Pyruvatnachschieb, in Kombination mit einer fehlenden (anaeroben) Glycolyse, ist in dieser Phase die Symptomausprägung besonders stark. Trotz der angenommenen Restriktion des oxidativen Metabolismus konnte kaum eine Arbeitsgruppe bisher einen übergroßen Abfall der ATP-Vorräte im arbeitenden, phosphorylasedefizienten Muskel feststellen (Argov et al., 1987; Sahlin et al., 1990; Löfberg et al., 2001;), weswegen es unwahrscheinlich ist, dass reduzierte ATP-Spiegel als solche die Symptome verursachen (Sahlin et al, 1990). Nur Zange et al. (2003) wiesen in einer ^{31}P -MRS-Studie bei McArdle-Patienten einen sowohl an ATP als auch an Creatinphosphat statistisch signifikant größeren Abfall nach Muskelarbeit nach.

Neben der Hypothese des gestörten oxidativen Metabolismus existieren daher andere Theorien, die auf pathophysiologischen Auffälligkeiten beruhen, die für die Symptome bei McArdle-Patienten (mit)ursächlich sein können. So implizieren verminderte Na^+/K^+ ATPase- und Ca^{2+} ATPase- sowie erhöhte extrazelluläre K^+ -Spiegel dysfunktionale sarkolemmale Erregungsvorgänge (Martinuzzi et al., 2003). Das lokal etwa 2-fach erhöhte Serumkalium könnte als potenter Vasodilatator und Aktivator sympathischer Affenzen für das während körperlicher Belastung erhöhte kardiovaskuläre Antwortverhalten verantwortlich sein (Haller et al., 1997).

1.3.5. Therapiemöglichkeiten

Trotz einiger Studien, die sich bisher mit therapeutischen Interventionen verschiedenster Art beschäftigt haben (Argov et al., 1987; Vissing und Haller, 2003; Haller et al., 2006; Howell et al., 2008), sind bis jetzt keine adäquaten Behandlungsmöglichkeiten der Myopathie McArdle entwickelt worden. In diversen Arbeiten wurde über eine Verbesserung der Leistungsfähigkeit durch intravenöse (Argov et al., 1987; Lewis und Haller, 1986) oder orale (Vissing und Haller, 2003) Kohlenhydratgabe berichtet. Haller et al. (2006) berichteten über eine Steigerung der Leistungsfähigkeit und Sauerstoffaufnahme durch moderates Ausdauertraining. Howell et al.

(2008) machten Schritte in Richtung einer gentherapeutischen Beeinflussung der Myophosphorylaseexpression. Keine der vorgeschlagenen Therapiemöglichkeiten stellt bisher jedoch eine ausreichende Verbesserung und geeignete Behandlungsmethode dar (Lucia et al., 2008).

1.4. Die Enzyme AMPD und AK

1.4.1. Die Adenosinmonophosphatdeaminase (AMPD)

Dieses in allen Eukaryoten vorkommende Enzym (Sabina et al., 1987) übernimmt mit der Deaminierung des AMP zu IMP eine zentrale Rolle im Stoffwechsel der Purine.

Das Enzym ist in vielen Geweben vorhanden (Ashby et al., 1979), wobei die Enzymaktivität der Skelettmuskelzellen die der anderen Gewebe und Organe übersteigt (Meyer und Terjung, 1979; Sabina et al., 1984). Neben der M-Isoform - der Myoadenylatdeaminase (MAD) - kommen noch zwei weitere, genetisch unabhängig voneinander regulierte Isoenzyme vor: die Leber- und die Erythrozytenisoform (Van Kuppevelt et al., 1994). Kodiert werden diese durch die entsprechenden Gene AMPD1, AMPD2 und AMPD3. Daher rührt der Umstand, dass Individuen mit einer Mutation im AMPD1-Gen keine verminderten AMPD-Aktivitäten in anderen Geweben aufweisen (Fishbein, 1985).

Das zytosolische Enzym ist an die Myosinfilamente des A-Bandes im Sarkomer der Muskelzelle gebunden (Ashby et al., 1979). Obwohl in beiden Muskelfasertypen vorhanden, ist das Enzym in 3- bis 10fach höherer Menge in den schnellen, glykolytischen Typ II Muskelfasern vorhanden - eine Tatsache, die durch die positive Korrelation von Fasertyp II-Menge und AMPD-Aktivität von Fishbein (1985) beobachtet und später durch immunologische und molekulargenetische Nachweisverfahren bestätigt wurde (Sabina et al., 1987; Van Kuppevelt et al., 1994).

Die Bedeutung der durch die AMPD katalysierten Reaktion (3) liegt in ihrer Beeinflussung anderer, für den Energiehaushalt der Muskelzelle wichtiger Stoffwechselfvorgänge: durch den Abbau des AMP zu IMP und Ammoniak wird das Gleichgewicht der durch die AK katalysierten Reaktion (2) zu Gunsten der ATP-Neubildung verschoben; ein Umstand, der bei der Ausübung exzessiver, insbesondere ischämischer Muskelarbeit, die zur Erschöpfung vorhandener Energieressourcen führt, besondere Bedeutung annimmt (Norman et al., 1998). Die funktionelle Kopplung mit der Adenylatkinase führt zu der Hypothese, dass die AMPD wesentlich zu einer Abmilderung des während muskulärer Arbeit absinkenden ATP:ADP-Quotienten beitragen kann (Fishbein et al., 1978, Sabina et al., 1980). Zudem ist die Deaminierung von AMP der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Purinnukleotidzyklus,

1 EINLEITUNG

dessen Bedeutung für den Energiestoffwechsel des Muskels Diskussionsgegenstand der Literatur ist (Lowenstein, 1990; Gibala et al., 1997; Tarnopolsky, 2001).

Verschiedene Faktoren können Einfluss nehmen auf Gehalt und Aktivität der AMPD im Muskel: Neben dem bereits weiter oben dargestellten Einflussfaktor Muskelfasertyp kann der körperliche Trainingszustand und das Geschlecht Einfluss auf die AMPD-Aktivität nehmen (Lowenstein, 1990; Norman et al., 1998). Die Einflussnahme des Geschlechts konnte durch eine andere Studie nicht bestätigt werden (Hanisch et al., 2008). Neben der Frage, ob die Muskeln weiblicher Individuen eine geringere AMPD-Aktivität aufweisen wird auch die Frage diskutiert, inwieweit das Auftreten einer Muskelerkrankung die Enzymspiegel senken kann (Fishbein 1985, 1999; Verzijl et al., 1999; Hanisch et al., 2008).

Auf die Enzymkinetik der allosterisch regulierten AMPD Einfluss nehmend sind vor allem die Purinnukleotide (Mineo et al., 1985). ADP gilt als stärkster Aktivator, indem es die Affinität der AMPD für die Inhibitoren GTP und ATP senkt (Lowenstein, 1990). Sehr hohe Mengen an ATP aktivieren die AMPD wiederum ebenfalls, während physiologische Konzentrationen an Phosphat hemmend wirken (Ashby, 1979; Lowenstein, 1990). Das pH-Optimum von 6,2 und die Beobachtung, dass langanhaltend ischämische Bedingungen zu größeren Auslenkungen in steigenden IMP-Spiegeln im arbeitenden Muskel führten, haben Whitlock und Terjung (1987) dazu veranlasst, Laktat als einen der Hauptaktivatoren der AMPD anzusehen. In einer Arbeit von Katz et al. (1986) war jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Laktatgehalt und der Enzymaktivität der AMPD gesehen worden, sodass diese Autoren in ihrer Arbeit davon ausgingen, dass die höchsten Enzymaktivitäten in Zellen zu finden sind, die den größten ATP-Umsatz und die niedrigsten CrP-Spiegel aufweisen.

Zusammengenommen scheint demnach eine Kombination verschiedener Faktoren eine Rolle bei der Beeinflussung der AMPD-Aktivität zu spielen, die wahrscheinlich den pH-Wert der Zelle, verschiedene allosterische Aktivatoren sowie die Konzentrationen der (de)phosphorylierten Nukleotide umfassen. Ausschlaggebend für das Gleichgewicht zwischen ATP und ADP wiederum ist die oxidative Kapazität, welche neben dem Muskelfasertyp auch durch äußere Faktoren, wie dem Trainingszustand, beeinflusst werden kann.

1.4.2. Der Myoadenylatdeaminasemangel (MADD)

Der Myoadenylatdeaminasemangel (AMPD-Mangel) ist mit einem Vorkommen von ca. 2 % in der europäischen Bevölkerung der häufigste Enzymmangel (Norman et al., 1998; Gross, 1997; Tarnopolsky et al., 2001). Das für die MAD codierende Gen AMPD1 liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 (Sabina et al., 1990). Die weitaus häufigste Mutation dieses Gens - c.C34T oder p.Q12X genannt - äußert sich im Austausch der Base Cytosin gegen Thymin an der 34.

1 EINLEITUNG

Nukleotidposition des Exon 2 (Morisaki et al., 1992) und resultiert in einem Funktionsverlust des Enzyms.

Der von Engel et al. 1964 erstbeschriebene Defekt wird autosomal rezessiv vererbt (Tarnopolsky et al., 2001). Bei einer homozygoten Konstellation der für den MAD-Mangel verantwortlichen Mutation beträgt die nachweisbare Restaktivität des Enzyms meist unter 2% der Aktivität gesunder Kontrollen (Sabina et al., 1980; Norman et al., 1995).

Die erstmals von Fishbein (1985) bei enzymdefizienten Patienten beobachteten Symptome Myalgien, Crampi und vermehrte Muskelschwäche nach Kraftanstrengung sowie eine verminderte Muskelmasse und verzögerte Muskelrelaxation (Hancock et al., 2005) wurden von verschiedenen Autoren mit der zentralen Rolle, die die AMP-Deaminase im Energiestoffwechsel des Muskels einnimmt, assoziiert (Sabina et al., 1984; Gross, 1997).

Zwei Faktoren führten seit der Entdeckung des MADD zu Diskussionen in der Literatur hinsichtlich der Bedeutung dieses Gendefekts für den Menschen: Die große Variabilität des klinischen Bildes (Sabina et al., 1980; Tarnopolsky et al., 2001) und die hohe Mutationsfrequenz: ca. 2% der Bevölkerung sind homozygot (TT) und ca. 20% heterozygot (CT) für die häufigste Mutation des AMPD1-Gens c.C34T (Morisaki et al., 1992; Gross, 1997; Verzijl et al., 1998; Fishbein, 1999). Die wenigsten Mutationsträger werden symptomatisch.

Die Tatsache, dass also mehr als ein von fünf Individuen Träger eines mutierten AMPD1-Allels ist (Norman et al., 2001) veranlasste unter anderen Verzijl et al. (1998) zu der Aussage, dieser Enzymmangel sei lediglich eine harmlose genetische Variante.

Während jedoch einige Autoren bei der Durchführung von Belastungstests keine signifikanten Unterschiede in der körperlichen Fitness AMPD-defizienter Probanden (Norman et al., 1995; Tarnopolsky et al., 2001) sowie keine phänotypischen Unterschiede in Gruppen homozygoter Mutationsträger im Vergleich mit Kontrollen feststellen konnten und demzufolge eine entscheidende Rolle des Enzyms und des PNZ im Muskelstoffwechsel anzweifeln (Tarnopolsky et al., 2001; Hanisch et al., 2008, 2011) resultierten die Ergebnisse anderer Studien in schnellerer Ermüdbarkeit und durchschnittlich niedrigerer Kraftentwicklung (Sabina et al., 1984; Fischer et al., 2007) bei Individuen mit diesem Enzymmangel.

1.4.3. Die Adenylatkinase (AK)

Dieses Enzym trägt wesentlich zu der Homöostase der zellulären Purinnukleotidzusammensetzung bei. Die Adenylatkinase katalysiert im Skelettmuskel die Reaktion (2), die der alternativen ATP-Produktion dient. Ihre wichtige physiologische Funktion hat zu intensiver Forschung in den letzten Jahren geführt. Diese enthüllte seit 2005 die Existenz von 5 weiteren Isoenzymen der AK - zuvor waren lediglich 3 bekannt.

1 EINLEITUNG

Die acht Isoenzyme der Adenylatkinase befinden sich in unterschiedlichen Zellkompartimenten (Noma, 2005; Panayiotou et al., 2011). Bis auf die außer in Erythrozyten in jedem Gewebe vorkommende mitochondriale AK3 sind die Isoenzyme zudem organspezifisch verteilt. Die im intermembranösen Raum der Mitochondrien befindliche AK2 beispielsweise ist hauptsächlich in schnell proliferierenden und mitochondrienreichen Zellen, und daher vor allem in Leber und Herz (Noma, 2005), aber auch im Skelettmuskel (Panayiotou et al., 2011) vorhanden. Die Haupt- und damit Referenzform der Adenylatkinase, das Isoenzym AK1 - die Myoadenylatkinase (MAK) - wird am meisten exprimiert in Organen hoher Energieumsätze, also in Skelett- und Herzmuskel, Gehirn und Erythrozyten; wobei die höchste Enzymaktivität in Korrelation zur höchsten mRNA-Expression im Skelettmuskel zu finden ist (Noma, 2005). Im Vergleich der Muskelfasertypen ist die MAK, ähnlich der AMPD, in 5fach stärkerer Konzentration in den glykolytischen, schnell kontrahierenden Typ II-Fasern vorhanden (Fishbein, 1985).

Neben der alternativen ATP-Bereitstellung in Situationen akkumulierenden Adenosindiphosphats (Hancock et al., 2005) und der Aufrechterhaltung hoher ATP-Spiegel in Zusammenarbeit mit den Stoffwechselfvorgängen der Mitochondrien (Panayiotou et al., 2011) nimmt die AK die Funktion eines Energietransporters wahr. Neben der einfachen, langsamen Diffusion des ATP innerhalb der Zelle existiert das Modell eines Transfersystems des energiereichen Phosphats entlang des Zytoskeletts der Zelle. Die mit dem Zytoskelett assoziierte AK1 de- und rephosphoryliert ihre Substrate ADP bzw. AMP und trägt so in Form einer enzymatischen Kettenreaktion zum schnellen Transports des ATP an die Orte seines Verbrauchs bei (Noma, 2005). Zeleznikar et al. (1990) vermuten in der Transportfunktion zwischen glykolytischem Stoffwechsel und ATPasen überhaupt die wesentliche Aufgabe des Enzyms. Die Hypothese wird mit der Beobachtung einer Korrelation zwischen besonders aktiven Umsatzraten von Glucose in der anaeroben Glycolyse und hohen AK-Aktivitäten bei gleichbleibend hohen ATP-Spiegeln untermauert. Nach Meinung der Autoren sei die AK-Reaktion also keineswegs nur „Behelfsreaktion“ eines kompromittierten ATP-Haushalts. Die verschiedenen Adenylatkinase-Isoformen nehmen außer an der Aufrechterhaltung der Homöostase der Purinnukleotide auch an anderen Stoffwechselprozessen teil (Panayiotou et al., 2011). Einige Funktionen werden bei der Betrachtung der genetischen Enzymdefekte und ihrer Auswirkungen auf den menschlichen Organismus deutlich.

Der bevorzugte Phosphatgruppendonator bei der reversiblen Transphosphorylierung von AMP ist ATP, bzw. im Fall der AK3 GTP. Letzteres entsteht im Citratzyklus (Noma, 2005). Zellen, die einen hohen Umsatz an ATP haben, besitzen besonders große Mengen an AK, wie die Skelettmuskelzellen (Zeleznikar et al., 1990). Hier ist die AK wiederum besonders konzentriert

1 EINLEITUNG

vorhanden an Orten der ATP-Bildung, den Mitochondrien, und des ATP-Verbrauchs, den Myofibrillen (Zeleznikar et al., 1990), deren Funktionen die Enzymaktivität beeinflussen. Die mit den Kontraktionsvorgängen der Myofibrillen assoziierten Änderungen der ADP-Spiegel nämlich beeinflussen im Wesentlichen die Aktivität der AK (Zeleznikar et al., 1990).

Ein weiterer die AK-Aktivität positiv beeinflussender Faktor ist laut Zeleznikar et al. (1990) die Sauerstoffdeprivation. Hyperglykämie Zustände hingegen führen zu einer verminderten AK-Expression (Stanojevic et al., 2008).

1.4.4. Der Adenylatkinasemangel

Ein Mangel an AK1 ist assoziiert mit einer seltenen Form der hämolytischen Anämie (Matsuura et al., 1989; Panayiotou et al., 2011). Eine Mutation im AK2-Gen verursacht eine angeborene schwere Immunerkrankung, die retikuläre Dysgenese, und die Isoformen AK1 und AK5 spielen in der Regulierung der Kalium-ATP-Kanäle der β -Zellen des Pankreas, und damit der Insulinsekretion, eine Rolle. Ein AK1-Mangel kann Folge eines hyperglykämischen Stoffwechsels und damit beteiligt am dysfunktionalen Zusammenspiel zwischen Blutzucker und Insulinsekretion bei Diabetikern sein (Stanojevic et al., 2008).

1.5. Die Housekeeping-Enzyme CS und PGI

Housekeeping-Enzyme sind ubiquitär vorhanden und übernehmen im Stoffwechsel essentielle Funktionen des Lebens der Zelle. Wegen der natürlichen Fülle ihres Vorkommens und ihrer konstanten Präsenz wird ihre Expression genutzt für die Beurteilung der relativen Mengenregulation anderer Genprodukte (Pancholi und Chhatwal, 2003).

Die Citratsynthase befindet sich in der mitochondrialen Matrix und wird häufig genutzt als mitochondrialer Marker, da sie proportional zu dem Mitochondriengehalt der Zelle bzw. des untersuchten Gewebes vorhanden ist. Bisher sind keine menschlichen CS-Mangelerkrankungen bekannt (Reisch und Elpeleg, 2007).

Die Phosphoglucoisomerase ist ein zytosolisches Enzym und spielt eine Schlüsselrolle in der Glycolyse und Gluconeogenese indem es die reversible, gegenseitige Umwandlung von Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat katalysiert. Somit ist die PGI ein geeigneter Marker für das zytosolische Kompartement. Außerdem fungiert die PGI extrazellulär als Zytokin (Funasaka et al., 2005).

2. Zielstellung

Die Zielstellung war, ob der exzessive Anstieg von Ammoniak nach motorischer Belastung bei McArdle-Patienten (Rumpf et al., 1981; Mineo et al., 1985, 1987; Coleman et al., 1986; Sinkeler et al., 1986 a; Kazemi-Esfarjani et al., 2002; Gómez-Gallego et al., 2008) erklärbar ist durch eine Enzyminduktion der AMP-Deaminase (AMPD), welche den Abbau von AMP zu IMP unter der Abspaltung von Ammoniak katalysiert.

In engem funktionalen Zusammenhang mit der AMPD steht die AK, weshalb die Aktivität dieses Enzyms ebenfalls in den Muskelhomogenaten der Glycogenose-Patienten mit Kontrollwerten verglichen werden sollte.

Als Referenz sollten die Housekeepingenzyme Citratsynthase (CS) und Phosphoglucoisomerase (PGI) dienen.

Da der ACE-Polymorphismus als beeinflussender Faktor der phänotypischen Krankheitsausprägung bei McArdle-Patienten diskutiert wurde, bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, einen möglichen Einfluss des ACE-Polymorphismus auf die Aktivitäten der 4 in dieser Arbeit untersuchten Enzyme AMPD, AK, CS und PGI zu untersuchen.

3. Patienten

3.1. Patienten und Kontrollen

Die Diagnose aller 11 McArdle-Patienten beruhte auf dem biochemisch nachgewiesenen Fehlen der Phosphorylaseaktivität sowie dem molekulargenetischen Nachweis einer homozygoten oder compoundheterozygoten Mutation des Phosphorylasegens. Dabei fand sich hier nur bei 8 der 22 untersuchten Allele des PYGM-Gens die häufigste p.R50X-Mutation.

Die Biopsien der Kontrollgruppe stammen von 27 Patienten, die weder klinisch, noch elektrophysiologisch, laborchemisch (bezüglich der CK) oder histopathologisch einen Anhalt für eine Muskelerkrankung gezeigt haben.

Voraussetzung der Rekrutierung der Kontrollen war das Vorhandensein eines Laktat-Ischämietest-Ergebnisses, wobei nur von 4 der 11 McArdle-Patienten LIT-Ergebnisse vorlagen (Abb. 3).

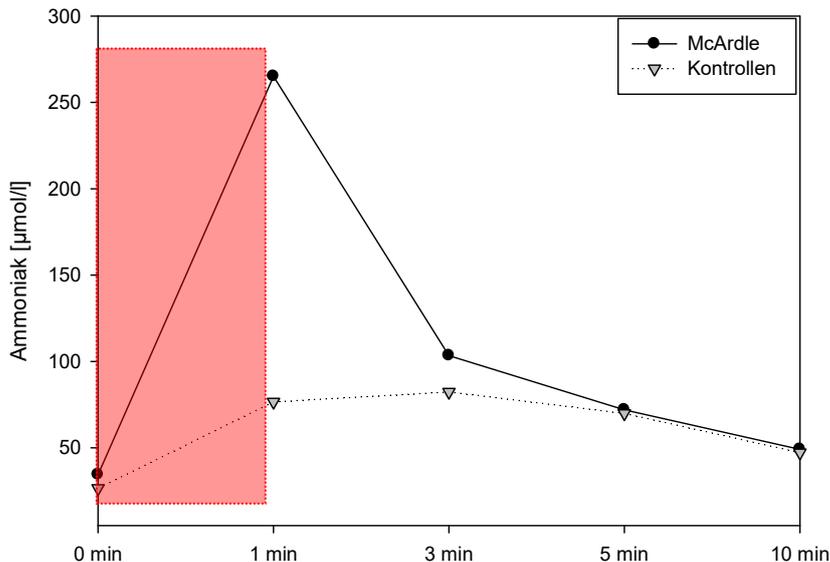


Abb.3: Ammoniakkonzentrationen 1,3,5 und 10 Minuten nach dem Beginn von 60-sekündigen, ischämischen Muskelkontraktionen (diese sind durch die rote Fläche dargestellt). Der 0-Minutenwert entspricht dem basalen Wert vor Beginn der Kontraktionen.

Besonders groß ist die Diskrepanz zwischen dem Wert der 4 Patienten (Punkt mit durchgezogener Linie) und dem der 27 Kontrollen (Dreieck mit gestrichelter Linie) sofort nach Beendigung der ischämischen Muskelarbeit (Minute 1). Gegen Aufzeichnungsende gleichen sich die Werte der Patienten wieder den Kontrollen an.

3 PATIENTEN

Tabelle 1 führt alle Patienten, Tabelle 2 die Kontrollen unter Einbezug der Merkmale Geschlecht, PYGM-Mutation, Muskel und Alter zum Zeitpunkt der Probeentnahme auf (beide Tabellen befinden sich im Tabellenanhang, Kapitel 9). Einen Überblick über die Patienten- und Kontrollgruppe gewährt Tabelle 3.

Tabelle 3: durchschnittliche Alters- und Geschlechtsangaben der Patienten und Kontrollen

	McArdle	Kontrollen
n (m/w)	11 (4/7)	27 (17/10)
Alter in Jahren (MW \pm SD)	41,7 \pm 19,3	38,7 \pm 11,9
Range in Jahren	13 – 69	17 – 64

n = Anzahl, Zahlen in Klammern entsprechen der Aufteilung in das Geschlecht (männlich/weiblich)

3.2. Muskelbiopsien

Alle biochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen wurden an menschlichem Muskel in offener Biopsie vorgenommen, der zu diagnostischen Zwecken entnommen und nach der Entnahme mit isotoner Natriumchloridlösung gespült, von Fett- und Bindegewebe frei präpariert und anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren worden war.

4. Material und Methoden

4.1. Reagenzien

Es wurden für die biochemischen Untersuchungen folgende Chemikalien und Enzyme verwendet: α -Ketoglutarat, bovines Albumin 0,2%, AMP, DTNB, EDTA, bovine Glutamat-Dehydrogenase [40U/mg], Gly-Gly, Imidazol, Oxalacetat, HK/G6PDH (*S.cerevisiae*) [239HK U/mg Protein; 111 G6PDH U/mg Protein] und TRIS von der Firma SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland; Acetyl-Coenzym A, HCl, KCl, $MgCl_2$ und NADPH von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; und NADP, Fructose-6-P, G6P-DH und ADP von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland sowie BCA Protein Assay Reagent A und B von der Firma Thermo Fisher Scientific. Die Firma Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland lieferte KOH und NaOH, die Firma Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland D-Mannitol und von Ferak GmbH Berlin wurde Triton X-100 sowie Glucose von AppliChem, Darmstadt, Deutschland bezogen.

Für die molekulargenetischen Untersuchungen wurde EDTA-Lösung, pH 8.0 und TRIS Base von AppliChem bestellt. Die d-NTP-Stammlösung sowie 10x Q Puffer, Taq Polymerase und Q Lösung wurde als Kit von QIAGEN bezogen. Von Merck KG wurde 96%ige Essigsäure und Borsäure bestellt. Die Primer AMPD1F- und R und ACE-F- und R sowie Agarose-Ultra Pure wurden von der Firma Invitrogen geliefert. Die Firma Thermo Scientific (Fermentas) lieferte DNA-Längenmarker- und Farbstoff („6x Orange DNA Loading Dye“) für die Gelelektrophorese sowie die für den Restriktionsvorgang notwendigen Substanzen Puffer R und das Enzym *TaiI*. Für die Herstellung des Polyacrylamidgels wurde Acrylamid Gel 40 und TEMED von der Firma Roth und für das 2% Agarosegel peqGold Universal Agarose von der Firma Peqlab bezogen.

4.2. Geräte

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Microplate Reader Model 680 von Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland; zusätzlich wurde eine Zentrifuge Model 5415R von Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland und von gleicher Firma der Thermomixer MTP sowie Mikrottestplatten mit E-Profil der Firma Roth benutzt.

Die Enzymaktivitätsbestimmungen erfolgten mit dem Spektralphotometer Model Cary 50 von Varian, Darmstadt, Deutschland mit der Software Varian WIN UV Version 2.0 conc und für die molekulargenetischen Untersuchungen wurden der Thermocycler Model GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer corporation, Norwalk, USA und die UV-Photoeinrichtung GeneFlash der Firma Imgen Technologies, USA, verwendet. Als weitere Hilfsmittel und Geräte

4 MATERIAL UND METHODEN

dienten eine Präzisionswaage Model Analytic Standart der Fa. Sartorius Ag, Göttingen, Deutschland, ein pH-Meter Model pMX 3000 von WTW, Weilheim, Deutschland und 1,5ml Quarzküvetten Polystyrol „PS“ von Brand GmbH, Wertheim, Deutschland.

4.3. Molekulargenetische Methoden

4.3.1. Das AMPD1-Gen

Die Isolierung der DNA aus dem Muskelgewebe erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll mit dem peqGOLD Tissue DNA-mini kit (Fa. Quiagen). Nach Durchlaufen der Wasch-, Inkubations- und Zentrifugationsgänge wurde die DNA in spezielle DNA-Cups überführt.

Die Polymerasekettenreaktion wurde durchgeführt, um den DNA-Abschnitt zu amplifizieren, der im Falle einer Mutation die Transition enthalten würde.

In Tabelle 4 sind die verwendeten Primer dargestellt. Die Konzentrationen der Primer AMPD1-F und AMPD1-R betragen jeweils 10 pmol/µl.

Tab.4: Primer der Mutation p.Q12X (Sabina et al., 1987)

AMPD1 F 5' TGT TCA CAT ATT TTA TCT TG 3'
AMPD1 R 5' ATA CTC TGA CAA ATG GC 3'

Tab.5: PCR-Ansatz für p.Q12X

	Volumen
DNA	2,0µl
Primer AMPD1-F	2,5µl
Primer AMPD1-R	2,5µl
10* Q Buffer	2,5µl
dNTP (0,4 mM)	0,5µl
Taq. Polymerase	0,2µl
Wasser	9,8µl
Q Lösung	5,0µl

Die Substanzen wurden wie in Tabelle 5 dargestellt pipettiert, das DNA-Volumen steht dabei für eine Probe. Im Thermocycler fand die DNA-Amplifizierung in 32 Zyklen statt. Die Denaturierung erfolgte bei 94 °C, die Primerhybridisierung bei 45 und die Elongation bei 72 °C,

4 MATERIAL UND METHODEN

für jeweils 30 sek. Den 32 Zyklen gingen 5 min Denaturierung bei 94 °C voraus und dem letzten Zyklus schlossen sich 10 min Elongation bei 72 °C an.

Zur Kontrolle der PCR wurden jeweils 5 µl des Amplifikatprodukts mit 2 µl Farbstoff versetzt und ca. 1 h in einem 8%-igen Polyacrylamidgel bei einer Spannung von 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE (90 mM TRIS/Borat; 2 mM EDTA, pH 8) verwendet. Als Längenstandards dienten 50 bp-Marker. Durch anschließendes Färben im Ethidiumbromid 0,007%/TBE-Bad konnte das Elektrophorese-Produkt unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

4.3.2. Der Mutationsnachweis

Jeweils 8 µl des Amplifikats wurde mit 2 µl Restriktionspuffer R⁺, 0,2 µl Restriktionsenzym *Tai*I und 9,8 µl Wasser über Nacht bei 65 °C inkubiert und unter diesen Bedingungen gespalten. Bei der gesunden Kontrolle und den Patienten, die negativ für die Mutation sind, erkennt *Tai*I die Nukleotidsequenz ACGT und spaltet das Amplifikat in 2 Segmente von 52 bp und 40 bp. Liegt die Mutation p.Q12X vor, bei der Cytosin durch Thymin ersetzt ist, findet keine Spaltung statt.

Die Restriktionsprodukte wurden mit Farbstoff versetzt (je Probe 4 µl „6x Orange“) und in einem dafür zuvor gegossenem 8%-igen Polyacrylamid-Gel (3 ml 10x TBE-Puffer; 21 ml Aquadest; 6 ml Acrylamid Gel 40; 12 µl TEMED; 300 µl 10%-iges APS) elektrophoretisch bei 120 V aufgetrennt. Als Laufpuffer diente TBE und als Längenstandards 50 bp- und 100 bp-Marker. Neben einer Negativkontrolle (Wasser) wurden zum Vergleich eine gesunde Kontrolle sowie 2 Positiv-Kontrollen - eine homozygote und eine heterozygote Mutante - mitgeführt. Nach der Ethidiumbromid-Färbung konnte das Resultat der elektrophoretischen Auftrennung unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. In Abb.4 sind die Banden einer gesunden Kontrolle und die eines für die Mutation heterozygoten Patienten dargestellt, bei dem neben den zwei Fragmenten im 52 bp- und 40 bp-Bereich auch eine Bande im 92 bp-Bereich sichtbar ist, welche das ungespaltene Fragment darstellt. Dieses repräsentiert das Allel, welches die Transitionsmutation trägt.

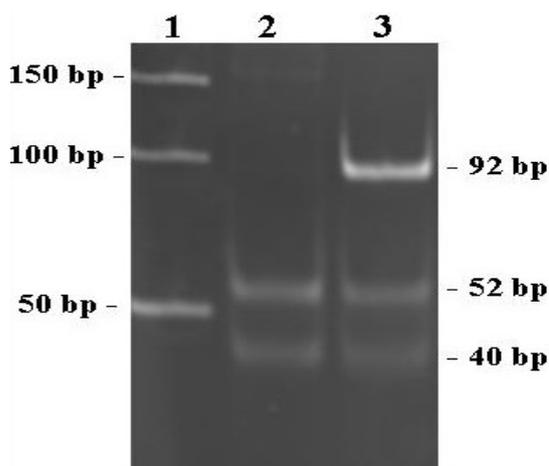


Abb.4: Bsp. für elektrophoretisch aufgetrennte Fragmente zur Darstellung der p.Q12X-Mutation.
1 = 50bp-Leiter; 2 = Wildtyp; 3 = heterozygot für die AMPD1-Mutation

4.3.3. Molekulargenetische Untersuchung des ACE-Gens

Die Länge des PCR-Produkts - ca. 190 bzw. 490 bp - richtete sich nach Vorhandensein (Insertion) bzw. Abwesenheit (Deletion) der 287 bp-Sequenz. Tabelle 6 stellt die verwendeten Primer dar.

Tab.6: Primer des ACE-Intron 16-I/D Polymorphismus (Rigat et al., 1992)

ACE F	5' CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCC 3'
ACE R	5' GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 3'

Tab.7: PCR-Ansatz

	Volumen
DNA	2,0µl
Primer ACE-F (c = 10 pmol/µl)	2,5µl
Primer ACE-R (c = 10 pmol/µl)	2,5µl
10* Q Buffer	2,5µl
dNTP (0,4 mM)	0,5µl
Taq. Polymerase	0,2µl
Wasser	9,8µl
Q Lösung	5,0µl

In Tabelle 7 sind die Reagenzien und deren Volumina, die den PCR-Ansatz pro Probe bildeten, dargestellt. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, das Insertionsallel bei heterozygoten D/I-Patienten nicht zu übersehen und falschpositive D/D-Ergebnisse zu vermeiden, wurde die Step down-PCR nach Chiang et al. (1998) angewandt. Diese gewährleistet durch eine schrittweise Annäherung an die Obergrenze der Primerhybridisierungstemperatur eine höhere Spezifität des Primers für seine Bindungsstelle, da diese Spezifität temperaturabhängig ist.

In der sich anschließenden DNA-Amplifizierung wurde in Form dieser Step down-PCR die Temperatur der Phase der Primerhybridisierung stufenweise um 5° C von 70 °C auf 60 °C verringert. Einer 5-minütigen Denaturierungsphase bei 95 °C folgte der erste Zyklus mit Denaturierung für 1 min bei 95 °C, Primerhybridisierung für 1 min bei 70 °C und Elongation für 1 min bei 72 °C. Nachdem dieser Zyklus 5 mal wiederholt wurde, folgten weitere 2 mal 5 Zyklen mit reduzierter Hybridisierungstemperatur auf 65 beziehungsweise 60 °C und anschließend 25 weitere Zyklen mit letzterer Hybridisierungstemperatur. Den insgesamt 40 Zyklen schlossen sich 10 Minuten finale Elongationszeit bei 72 °C an.

4.3.4. Der Deletionsnachweis

Je 5 µl des Amplifikats wurden mit 2 µl „6x Orange“-Farbstoff versetzt.

Die elektrophoretische Auftrennung fand in dafür zuvor gegossenem 2%-igem Agarosegel (3 g peqGold Universal Agarosepulver in 150 ml 1x TAE Puffer gelöst und aufgeköcht) unter einer Spannung von 120 V statt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE (40 mM TRIS/Acetat; 1 mM EDTA, pH 8) verwendet und ein 100 bp-Marker diente der späteren Bestimmung der Fragmentlänge. Neben der Negativkontrolle (Wasser) wurden 3 Proben, deren Allelmuster bekannt waren (D/D; D/I, I/I) zum Vergleich mitgeführt.

Das Ergebnis wurde nach einem Ethidiumbromid 0,007%/TAE-Bad unter UV-Licht sichtbar gemacht. Abbildung 5 stellt die Bandenmuster für den D/I-Polymorphismus dar.

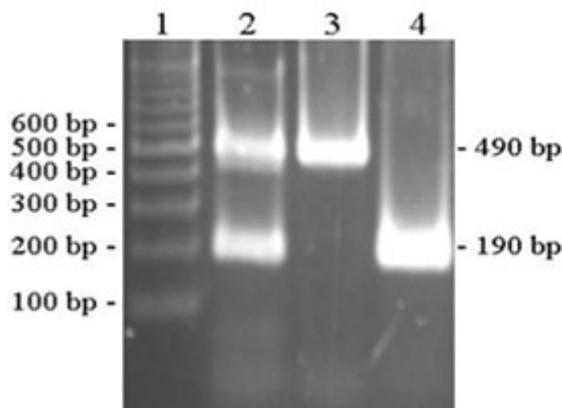


Abb.5: Bsp. für elektrophoretisch aufgetrennte Fragmente zur Darstellung des D/I Polymorphismus; 1 = 100bp Leiter; 2 = D/I; 3 = I/I; 4 = D/D

4.4. Biochemische Methoden

4.4.1. Aufarbeitung der Muskelproben

Zur Herstellung eines Homogenats wurde tiefgefrorener Muskel abgewogen und mit dem 29fachen Volumen an CHAPPEL-PERRY-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 1 mM EDTA) in einem Glas-Glas-Handhomogenisator für ca. 7 min auf Eis homogenisiert; anschließend wurde ein Teil des 1:30 Homogenats auf 1:100 verdünnt, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff weggefroren.

4.4.2. Spektralphotometrische Messungen

Die spektralphotometrischen Messungen erfolgten innerhalb des linearen Abhängigkeitsbereiches von Homogenatmenge zu Reaktionsgeschwindigkeit mit 1:30 und 1:100 verdünntem Homogenat. Es wurden Mehrfachmessungen mit Bildung eines Mittelwertes durchgeführt bei der jeweiligen Wellenlänge, die dem Absorptionsmaximum des verbrauchten oder gebildeten Stoffes entspricht. Als Referenz diente jeweils ein vollständig pipettierter Ansatz ohne Homogenat. Die zur Umsatzgeschwindigkeit proportionale Enzymaktivität wird unter Berücksichtigung des jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten des zur Änderung der Lichtabsorption führenden (Co)Substrates (respektive Produktes) und des Testvolumens von 0,001 l sowie einer Küvettenschichtdicke von 1 cm mit folgender Formel berechnet:

$$A \text{ [U/g FG]} = \frac{\Delta E/\text{min} \cdot \text{Vol}_{\text{Küvette}} \cdot F}{\varepsilon \cdot \text{Vol}_p}$$

Eine internationale Enzymeinheit entspricht dem Umsatz von 1 µmol Substrat pro Minute. Als Bezugsgröße der Messwerte dienen das Feuchtgewicht (FG) der Proben und das Nichtkollagen-Protein (NCP).

4.4.3. Die AMP-Deaminase (AMPD)

(in Anlehnung an Zöllner et al., 1986)

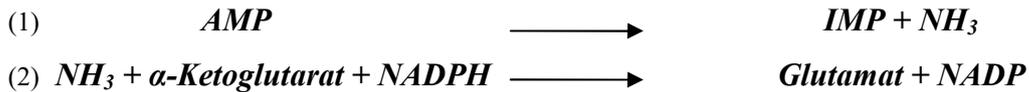
Alle Substanzen wurden, wenn nicht anders angemerkt, ausschließlich in bidestilliertem Wasser (Bidest) gelöst. Die Einstellung des pH-Wertes des Imidazol-Puffers (pH 6,5) erfolgte mit HCl. Für die Herstellung von 2 ml 50 mM AMP-Lösung wurden 1965 µl Bidest 35 µl 5 M KOH zugesetzt.

In eine Küvette wurden 250 µl 0,25 M Imidazolpuffer, 200 µl 0,5 M KCl, 20 µl 0,2 M MgCl₂, 40 µl 150 mM α-Ketoglutarat, 40 µl Glutamat-DH [902 U/ml] und 100µl 1,5mM NADPH

4 MATERIAL UND METHODEN

pipettiert und je nach Menge des 1:30 verdünnten Homogenates (5; 7,5; 10 µl) mit Bidest auf ein Gesamtvolumen von 850 µl aufgefüllt.

Die Messung des NADPH-Verbrauches erfolgt aus der Extinktionsabnahme bei 340 nm. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieses zusammengesetzten Tests ist der erste Schritt, die Umsetzung des AMP durch die zu messende AMPD.



Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für 5 min bei 30 °C. Anschließend wurde die Reaktion mit 150 µl 50 mM AMP gestartet. Die Messzeit betrug 5 min. Unter Einbezug von $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6200 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$ war die Berechnung der AMPD-Aktivität möglich.

4.4.4. Die Adenylatkinase (AK)

(in Anlehnung an Bergmeyer, 1974; hier neue Testetablierung)

Die Lösung des 250 mM Gly-Gly-Puffers, pH 7.6, und aller anderen Substanzen sowie die Verdünnung des Hilfsenzymgemisches auf 20 U/ml HK und 10 U/ml G6P-DH erfolgte mit Aqua bidest.

Die Etablierung des Tests erforderte die Variation der Konzentrationen an den Substraten NADP, ADP und Glucose sowie das Austesten der Menge an Hilfsenzym in Sättigung, aufgeführt in Tabelle 8:

Tab.8: Pipettieransatz für einen Testansatz. Dabei wurden die Volumina von NADP, ADP, Glucose und Hilfsenzym nach gewünschter Konzentration in 1 ml variiert

	Testkonzentration	Volumen
Gly-Gly-Puffer	50 mM	200 µl
MgCl ₂	10 mM	50 µl
Glucose	0,5/1/3/5/7/10/12/15/20/25/30/35/40/45/50 mM	0,5 - 50 µl
ADP	0,5/1/1,5/2/3/4/6/8 mM	12,5- 200 µl
NADP	0,2/0,5/1/2/2,5/3/4/5 mM	10 - 250 µl
HK[20U/ml]/ G6P-	[0,8U/ml]/[0,4U/ml] / [1,6U/ml]/[0,8U/ml] /	40 - 100 µl
DH[10 U/ml]	[2U/ml]/[1U] ml	
Aqua bidest		ad 1000 µl

4 MATERIAL UND METHODEN

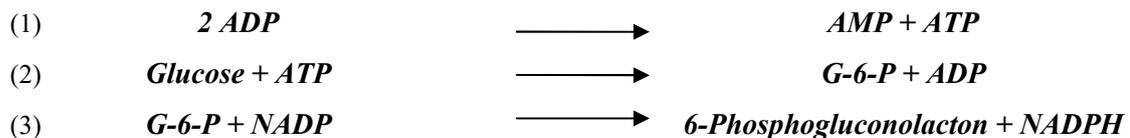
Im Anschluss an diese Konzentrationsabwandlungen wurde folgender Reaktionsansatz in eine Küvette pipettiert: 200 μl 250 mM Gly-Gly, 50 μl 200 mM MgCl_2 , 10 μl 1 M Glucose, 37,5 μl 40 mM ADP, 100 μl 20 mM NADP, 80 μl HK/G6P-DH.

Bei der Wahl der optimalen Verdünnung des Homogenats (1:10, 1:30, 1:50, 1:70, 1:100) war der Umstand der Proportionalität zwischen Homogenatmenge und Extinktion ausschlaggebend. Der Festlegung der Substrat- und Enzymkonzentrationen im Reaktionsansatz folgten noch 3 weitere Schritte zur Vervollständigung der Testetablierung:

- 1) Austesten der optimalen Inkubationszeit (1 min; 2 min; 5 min; 10 min; 20 min)
- 2) Untersuchung der Haltbarkeit des Homogenats (Wartezeit: keine; 30min; 1h; 4 h)
- 3) Eruiierung des geeigneten Blindwertes.

Für jede Konzentration und jede Reaktionsbedingung wurde die Extinktion der Reaktion gemessen und anhand des Wertes der höchsten Lichtabsorption die geeignete Reaktionsbedingung ermittelt.

Der aus 3 Folgereaktionen bestehende Test misst bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ die Änderung der Extinktion während der Zunahme des Produkts NADPH:



Die Inkubationszeit betrug 10 min bei 30 °C. Die Reaktion wurde gestartet mit 1:100 verdünntem Homogenat (5; 7,5; 10 μl). Mit $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6200 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$ wurde die Aktivität der AK berechnet.

4.4.5. Die Phosphoglucoisomerase (PGI)

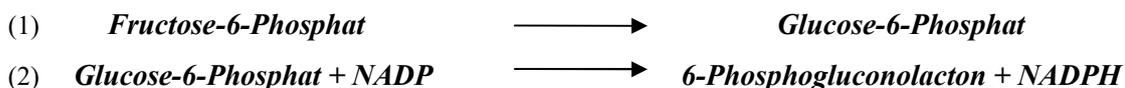
(in Anlehnung an Bergmeyer, 1974)

Der hergestellte TRIS-Puffer wurde mit HCl auf pH 8.0 eingestellt wurde. In TRIS/HCl gelöst wurden NADP und Fructose-6-Phosphat. Für die Herstellung von 1 ml EDTA-Lösung wurde zu 825 μl Puffer 175 μl 5M KOH-Lösung zugegeben. Die Verdünnung von G6P-DH erfolgte durch Zugabe von 200 μl Puffer zu 10 μl Enzym (350 U/mg).

Der Reaktionsansatz bestand aus 100 μl 0,5 M TRIS/HCl, 20 μl 0,25 M EDTA, 50 μl 0,01M NADP, 20 μl G6P-DH [0,7U] und, je nach Volumen des 1:100 Homogenats (5; 10; 20 μl), der entsprechenden Menge an Bidest zum Auffüllen des Volumens auf 980 μl .

4 MATERIAL UND METHODEN

Die Absorptionsänderung bei 340 nm beruht auf einer Zunahme des Produktes NADPH, welches in der zweiten Reaktion des zusammengesetzten Tests entsteht:



Die Reaktion wurde nach 10 min Inkubationszeit mit 20 μl 100 mM Fructose-6-Phosphat gestartet und die Aktivität der PGI mit $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6200 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$ berechnet.

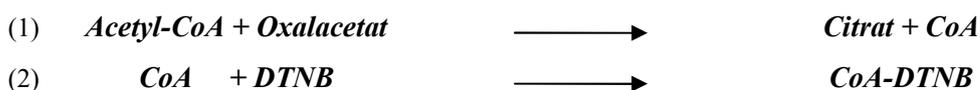
4.4.6. Die Citratsynthase (CS)

(in Anlehnung an Sheperd und Garland, 1969)

Die Einstellung des pH-Wertes des 50 mM TRIS/200 mM Mannitol-Puffers erfolgte mit HCl auf pH 7.4. DTNB wurde in 96% Ethanol gelöst; Acetyl-CoA in 50 mM TRIS/HCl, pH7.4, und für die Herstellung von 1 ml Oxalacetat-Lösung wurden 890 μl Bidest 110 μl 1M KOH zugesetzt.

In eine Küvette wurden 20 μl 5% Triton, 10 μl 10 mM DTNB, und 50 μl 2 mM Acetyl-CoA gegeben und je nach Menge des 1:100 verdünnten Homogenates (10; 20; 40 μl) mit der entsprechenden Menge 50 mM TRIS/200 mM Mannitol-Puffer auf 990 μl aufgefüllt.

Die Aktivitätsmessung der Citratsynthase erfolgt über die Zunahme des Produktes CoA-DTNB, welches einen Farbkomplex darstellt und bei einer Wellenlänge von 412 nm zu einer Absorptionsänderung führt:



Nach einer Inkubation von 10 min wurde der Messvorgang, der 220 s dauerte, durch die Zugabe von 10 μl 50 mM Oxalacetat gestartet. Anschließend wurde die CS-Aktivität mit $\epsilon_{\text{DTNB}} = 13600 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$ berechnet.

4.4.7. Quantifizierung des Nicht-Kollagenen-Proteins (NCP)

Zur Bestimmung des NCP nach dem BCA-Assay¹ (Wiechelman et al., 1988) wurden 10 µl 1:30 verdünntes Muskelhomogenat mit 90 µl NaOH versetzt und mindestens 1 Tag bei Raumtemperatur inkubiert. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 9000 Umdrehungen/min wurde das kollagene Protein abzentrifugiert. In den Wells der Mikrottestplatte wurden je 10 µl des vorbereiteten Homogenats mit 200 µl BCA-Lösung A+B (50 Teile BCA-Lösung A + 1 Teil BCA-Lösung B) versetzt. Mit Hilfe einer BSA-Standardlösung (0,125; 0,25; 0,5; 1,0 mg/ml) erfolgte die Erstellung einer Eichkurve, die der Ermittlung der eingesetzten Proteinmengen diene. Diese wurden auf die eingesetzten Mengen der Muskelprobe bezogen [mg NCP/ mg FG].

Zusammensetzung der Lösungen:

BCA-Protein Assay Medium A: Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA-Reagens und Natriumtartrat in NaOH-Lösung

BCA-Protein Assay Medium B: 4% ige Kupfersulfat-Lösung

4.5. Statistik

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm 1 Standardabweichung (SD) oder als Median. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe wurde mit dem Student t-Test oder, bei einer sehr kleinen Anzahl von Werten, mit dem Mann-Whitney-Rangsummentest für ungepaarte Daten errechnet. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angesehen bei einem Wert von $p < 0,05$.

Für die statistische Auswertung sowie die graphischen Darstellungen wurde das Softwareprogramm Sigmaplot 11 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA) verwendet.

¹ Der Test beruht auf einer Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ Ionen durch Proteine im alkalischen Milieu. Das reduzierte Kupfer bildet mit Bichinonsäure einen violetten Komplex, dessen Bildung photometrisch bei $\lambda = 550\text{nm}$ gemessen wird.

5. Ergebnisse

5.1. Das Metabolitverhalten (Laktat und Ammoniak) im Laktischämietest

Während von allen 27 Kontrollpersonen Testergebnisse vorlagen, konnte nur bei 4 der 11 McArdle-Patienten der LIT ausgewertet werden.

Dabei zeigte sich, dass in Bezug auf das Laktat die Serumspiegeldifferenzen bei den McArdle-Patienten erwartungsgemäß niedrig ausfielen: der Median der Laktatdifferenzen betrug bei den Kontrollen 3,90 mmol/l; bei den McArdle-Patienten lag er bei 0,35 mmol/l ($p = 0,002$).

Dem entgegen fiel der Ammoniakanstieg bei den McArdle-Patienten in etwa 5fach höher aus: Der Median der Ammoniakdifferenz betrug bei den McArdle Patienten 270,4 $\mu\text{mol/l}$ und in der Kontrollgruppe 54 $\mu\text{mol/l}$ ($p = 0,002$).

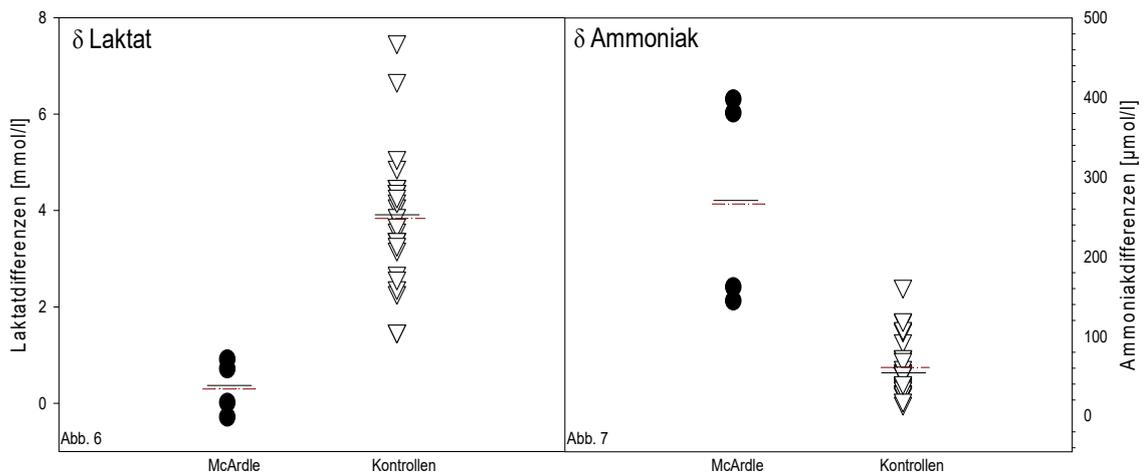


Abb. 6 und 7: Ergebnisse des LIT für die McArdle-Patienten und Kontrollen. Die Mittelwerte sind als unterbrochene Linien in diesem Punktdiagramm verzeichnet, die im Text genannten Medianwerte unterscheiden sich von den Werten kaum und sind als durchgängige Linien markiert.

Die Punktsymbole stellen die 4 McArdle Patienten dar; die Dreiecksymbole die 27 Kontrollen.

δ (delta) steht für den Abstand zwischen niedrigster und höchster Serumkonzentration.

5.2. Molekulargenetische Ergebnisse

5.2.1. Die AMPD1-Genotypen

Im Folgenden wurden sowohl die Gruppe der Kontrollen als auch die der McArdle-Patienten auf eine vorhandene c.C34T-Mutation des AMPD1-Gens untersucht, die mit einem AMP-Deaminasemangel vergesellschaftet ist.

Unter den Kontrollen waren insgesamt 7 Individuen heterozygot (CT) für diese Mutation, 20 Kontrollen wiesen keine Mutation auf (CC). In der Gruppe der 11 Patienten befanden sich 2 heterozygote Träger der c.C34T-Mutation. In keiner der beiden Gruppen befand sich ein homozygoter Träger der Mutation (TT).

Mit dem Fisher-Exact-Test wurde ausgeschlossen, dass sich die Proportionen in Bezug auf die Häufigkeit der CT-Allelkonstellation zwischen den beiden Gruppen signifikant unterscheiden.

Tabelle 9 stellt die Ergebnisse zusammengefasst dar.

Tab. 9: AMPD1-Genotypen bei McArdle-Patienten und Kontrollen

AMPD-Genotyp	McArdle (n = 11)	Kontrollen (n = 27)
CC	9	20
CT	2	7
TT	0	0

5.2.2. Ammoniakanstiege nach AMPD1-Genotyp

In der Gruppe der McArdle-Patienten lag der Ammoniakanstieg der 3 CC-Individuen im Mittel bei 312,6 $\mu\text{mol/l}$ und war damit zwar mehr als 2 mal so groß wie der Wert des einen CT-Patienten (143,6 $\mu\text{mol/l}$); dies war jedoch aufgrund der kleinen Fallzahl nicht statistisch verwertbar.

In der Gruppe der Kontrollen hatte der AMPD1-Genotyp keinen Einfluss auf die Höhe des mittleren Ammoniakanstieges; diese war nahezu identisch (CC: 60,8 \pm 39,2 $\mu\text{mol/l}$ vs. CT: 65,3 \pm 30,5 $\mu\text{mol/l}$; $p = 0,638$).

Abbildung 8 stellt die Ammoniakanstiege aufgetragen nach CC- und CT-Genotyp der Patienten und Kontrollen dar.

5 ERGEBNISSE

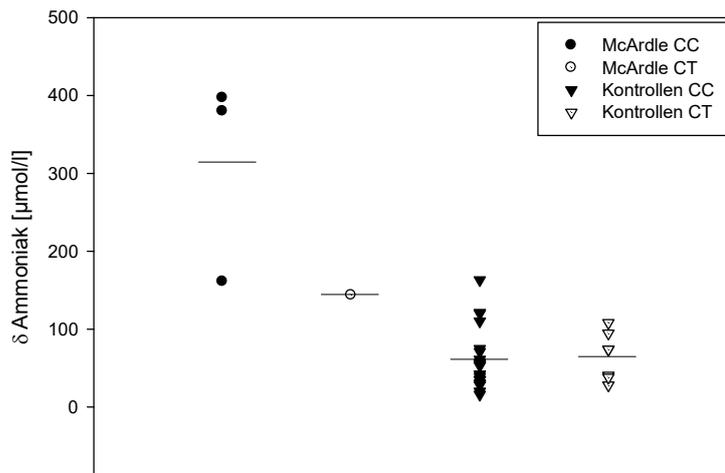


Abb.8: Ammoniakanstiege aufgetragen nach AMPD-Genotyp. Innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe sind die Unterschiede zwischen CC- und CT-Individuen hinsichtlich der Metabolitanstiege nicht statistisch signifikant. Die Kreissymbole stellen die Patienten dar, die Dreiecke symbolisieren die Kontrollen (offene Symbole = heterozygot, CT; geschlossen = homozygot, CC). Die Linien symbolisieren die Mittelwerte.

5.2.3. Der ACE-Gen-Polymorphismus

Es sollte in dieser Arbeit ein möglicher Zusammenhang des D/I-Polymorphismus des ACE-Gens auf die Aktivitäten der beiden Enzyme AMP-Deaminase und Adenylatkinase sowie der beiden Housekeepingenzyme Citratsynthase und Phosphoglucoisomerase untersucht werden. Da bereits für andere Zwecke der ACE-Polymorphismus der meisten in dieser Arbeit behandelten McArdle-Patienten analysiert worden war, stand an dieser Stelle lediglich die Untersuchung zweier Patienten aus.

Insgesamt hatten 3 Patienten den DD-Genotyp und 8 Patienten den DI-Genotyp. Kein Patient wies den II-Genotyp (2 Insertionen) auf, dargestellt in Tabelle 10.

Im Kapitel 5.3.5. werden die Aktivitäten aller Enzyme auf die D/I-Genotyp-Konstellationen bezogen, nachdem in den nächsten Kapiteln die Ergebnisse der spektralphotometrischen Aktivitätsmessungen der einzelnen Enzyme vorgestellt werden.

Tab. 10: Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen des Insertions-Deletions-Polymorphismus des ACE-Gens bei den McArdle-Patienten

ACE-Genotyp	Anzahl n
DD	3
DI	8
II	0

5.3. Biochemische Ergebnisse

5.3.1. Die AMP-Deaminase

Innerhalb der Gruppen der McArdle-Patienten sowie der Kontrollen wurden die Enzymaktivitätsergebnisse nach AMPD1-Genotyp aufgetragen, dargestellt in Abb. 9. In beiden Gruppen war der Mittelwert der AMPD-Aktivität unter den heterozygoten Trägern der AMPD1-Mutation statistisch signifikant geringer: 132,2 (\pm 37,4) vs. 429,2 (\pm 84,8) U/g NCP unter den McArdle-Patienten ($p = 0,001$) und innerhalb der Kontrollgruppe 219,5 (\pm 62,1) vs. 496,7 (\pm 96,1) U/g NCP ($p < 0,001$).

Die eigentliche Kernaussage der Arbeit ist, dass im Vergleich Patienten zu Kontrollen kein statistisch signifikanter Unterschied der Mittelwerte der AMPD-Aktivitäten zu verzeichnen war: Weder im Vergleich der CC-Individuen (429,2 \pm 84,8 U/ g NCP [McArdle] vs. 496,7 \pm 96,1 U/g NCP [Kontrollen], $p = 0,082$), noch zwischen den Gruppen der CT-Individuen (132,2 \pm 37,4 U/g NCP [McArdle] vs. 219 \pm 62,1 U/g NCP [Kontrollen], $p = 0,109$).

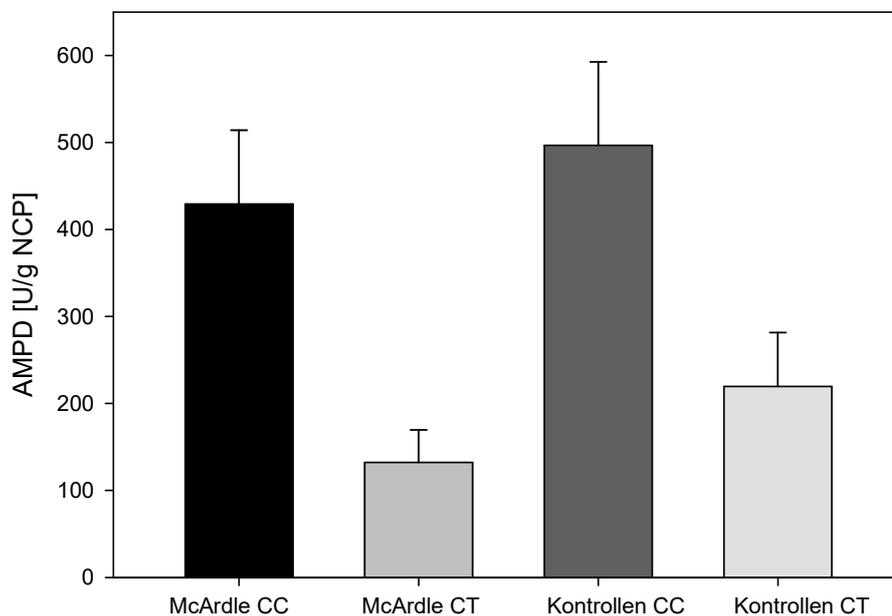


Abb. 9: Aktivitäten der AMPD bei McArdle und Kontrollen. CT = heterozygot für die c.C34T-Mutation (hellere Balken), CC = Wildtyp (dunklere Balken). Die beiden linken Balken stellen die McArdle-Patienten dar, rechts im Bild sind die CC- und CT-Kontrollen aufgeführt.

Signifikante Unterschiede bestehen zwischen Homo- und Heterozygoten, nicht jedoch zwischen den Patienten und Kontrollen.

5 ERGEBNISSE

Der Gesamtmittelwert der Enzymaktivitäten der AMPD in U/g NCP in der Gruppe der McArdle-Patienten betrug 375,2 (\pm 142,6) und war ebenfalls nicht statistisch signifikant verschieden von dem Gesamtmittelwert der Kontrollen 424,8 (\pm 151,5) (nicht bildlich dargestellt, $p = 0,359$).

5.3.2. Die Adenylatkinase

Das Ergebnis der Gesamtaktivität der Adenylatkinase der McArdle-Patienten war im Mittel nicht signifikant verschieden zu dem der Kontrollen: 3426,2 (\pm 1193,5) U/g NCP (McArdle) vs. 3586,2 (\pm 854,4) U/g NCP (Kontrollen), $p = 0,644$.

Eine Separierung der Adenylatkinasedaten nach c.C34T-Mutation ergab in der Gruppe der McArdle-Patienten ohne diese Mutation einen Durchschnitt von 3633,2 (\pm 1135,6) U/g NCP und unter den 2 Heterozygoten einen von 2494,4 (\pm 1343,6) U/g NCP. Der p -Wert beträgt 0,241; die Nullhypothese kann demnach nicht verworfen werden.

Unter den Kontrollen wich das Ergebnis der Träger der Mutation mit 3560,4 (\pm 963) U/g NCP ebenfalls nicht statistisch signifikant von dem der Wildtypträger ab (3595,2 \pm 840,1), $p = 0,928$. Im Vergleich der Wildtyp-McArdle-Patienten mit den CC-Kontrollen wiesen die Unterschiede der Mittelwerte keine statistische Signifikanz auf ($p = 0,920$); ebenso im Vergleich der CT-Patienten mit den heterozygoten Kontrollen ($p = 0,236$).

Die Abbildungen 10 und 11 stellen sowohl die Gesamtzymaktivitäten der AK dar, als auch die Unterteilung nach AMPD1-Genotyp.

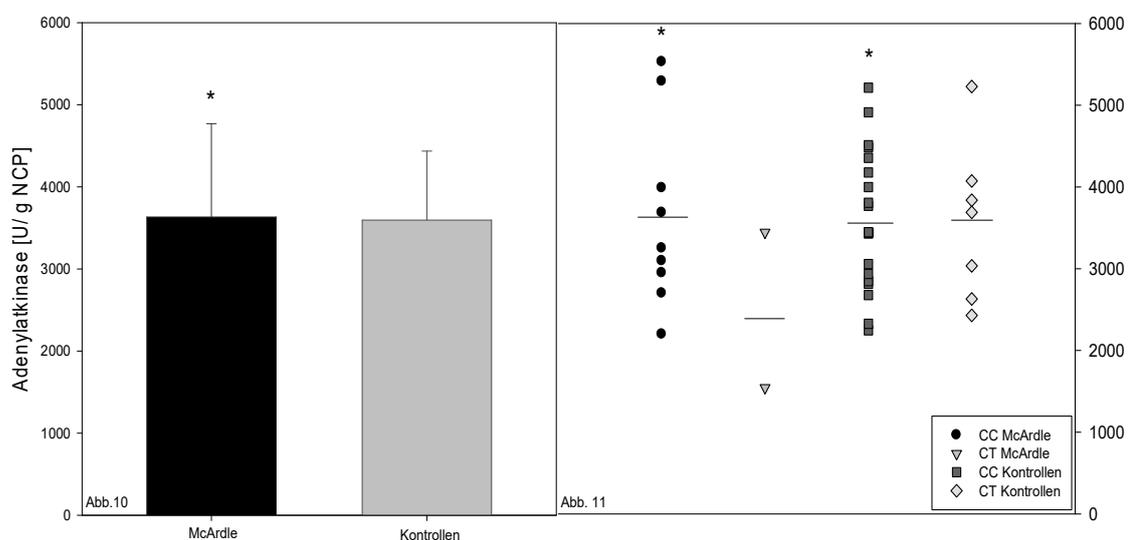


Abb. 10 und 11: Aktivitäten der Adenylatkinase bei Patienten und Kontrollen. Abb. 10 stellt die Gesamtaktivitäten dar; in Abb. 11 sind die AK-Aktivitäten aufgegliedert in AMPD1-Genotyp CT (heterozygot) und CC (Wildtyp) abgebildet. * = nicht signifikant.

5.3.3. Die Housekeepingenzyme Phosphoglucoisomerase und Citratsynthase

Ein überraschender Aspekt der Arbeit war der deutlich höhere Gesamtmittelwert der Enzymaktivitäten des Housekeepingenzym PGI in der Gruppe der McArdle-Patienten. Dieser lag mit $2702,8 \pm 548,4$ U/g NCP ca. 1,5 fach über dem Wert der Kontrollgruppe mit $1814,9 \pm 353,9$ U/g NCP, der p-Wert weist mit $< 0,001$ auf einen hochsignifikanten Unterschied hin (Abb.12).

Auch wiesen die Patienten höhere Aktivitäten des 2. Housekeepingenzym Citratsynthase auf; der Mittelwert lag mit $111,8 \pm 27,9$ U/g NCP statistisch signifikant über dem der Kontrollen ($87,6 \pm 25,4$ U/g NCP), $p = 0,014$. (Abb. 13).

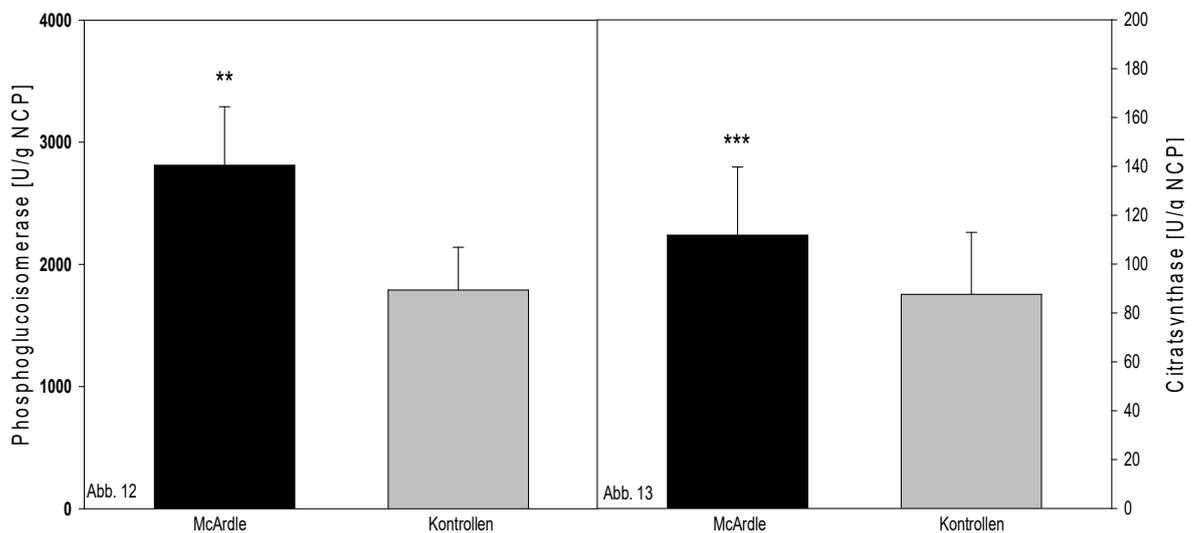


Abb. 12 und 13: Aktivitäten der Phosphoglucoisomerase und Citratsynthase.

** statistisch signifikant; $p < 0,001$

*** statistisch signifikant; $p = 0,014$

5.3.4. Bezugnahme der AMPD und AK auf die Housekeepingenzyme

Die Normierung der AMPD und der AK auf die Housekeepingenzyme PGI und CS wurde separat analysiert nach zugrundeliegendem Genotyp (CC und CT).

AMPD

Der Quotient AMPD/PGI war im Mittel sowohl bei den CC- als auch den CT-McArdle-Patienten mit $0,17 (\pm 0,04)$ vs. $0,25 (\pm 0,05)$, $p < 0,001$, bzw. $0,06$ vs. $0,11 (\pm 0,03)$ signifikant niedriger ($p = 0,045$) (Abb. 14).

5 ERGEBNISSE

Auch der Gesamtmittelwert aller Quotienten AMPD/PGI der McArdle-Patienten lag statistisch signifikant unter dem Ergebnis der Kontrollen: $0,15 (\pm 0,06)$ vs. $0,22 (\pm 0,08)$; $p = 0,011$ (nicht abgebildet).

In Bezug auf die Citratsynthase stellte sich der Unterschied zwischen den beiden Gruppen Patienten vs. Kontrollen nicht signifikant verschieden dar: Unter den CC Genotypen lag der Mittelwert des AMPD/CS Quotienten bei $4,29 (\pm 1,52)$ (McArdle) vs. $5,52 (\pm 2,09)$ (Kontrollen), $p = 0,126$. Der Mittelwert AMPD/CS der beiden McArdle-Patienten mit CT-Genotyp lag bei $1,36 (\pm 0,44)$ vs. $2,45 (\pm 0,95)$, $p = 0,127$ (Abb. 15).

Der Gesamtmittelwert des AMPD/CS-Verhältnisses aller McArdle-Patienten betrug $3,75 (\pm 1,81)$. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zu dem der Kontrollen ($4,72 \pm 2,30$); $p = 0,221$ (nicht abgebildet).

AK

Die Adenylkinaseaktivitäten wurden ebenfalls auf die Housekeepingenzyme PGI und CS bezogen.

Auch hier war es der deutlich höheren mittleren Enzymaktivität der PGI geschuldet, dass der Quotient AK/PGI in der Patientengruppe im Mittel mit $1,26 (\pm 0,31)$ statistisch signifikant unter dem der Kontrollen mit $2,02 (\pm 0,52)$ lag; $p < 0,001$.

Im Vergleich der CC-Individuen der McArdle- und Kontrollgruppe war der Quotient AK/PGI in der Patientengruppe kleiner ($1,29$ vs. $2,06$; $p < 0,001$). Zwischen den AK/PGI-Quotienten der heterozygoten Patienten und Kontrollen lag keine statistische Signifikanz vor (median $1,09$ vs. $1,78$; $p = 0,056$) (nicht bildlich dargestellt).

Der Median des Quotienten AK/CS lag mit $32,14$ nicht signifikant unter dem Ergebnis der Kontrollen mit $38,3$; der Rangsummentest ergab $p = 0,058$.

Das gleiche gilt für den Vergleich von CC-Patienten mit Kontrollen ($32,87$ vs. $46,40$; $p = 0,047$) und Heterozygoten ($25,88$ vs. $41,23$; $p = 0,29$). Da die Separierung in AMPD1-Genotypen im Falle der AK nicht die gleiche Relevanz besitzt, erfolgt die bildliche Darstellung der Gesamtquotienten AK/PGI und AK/CS (Abb. 16 und 17).

5 ERGEBNISSE

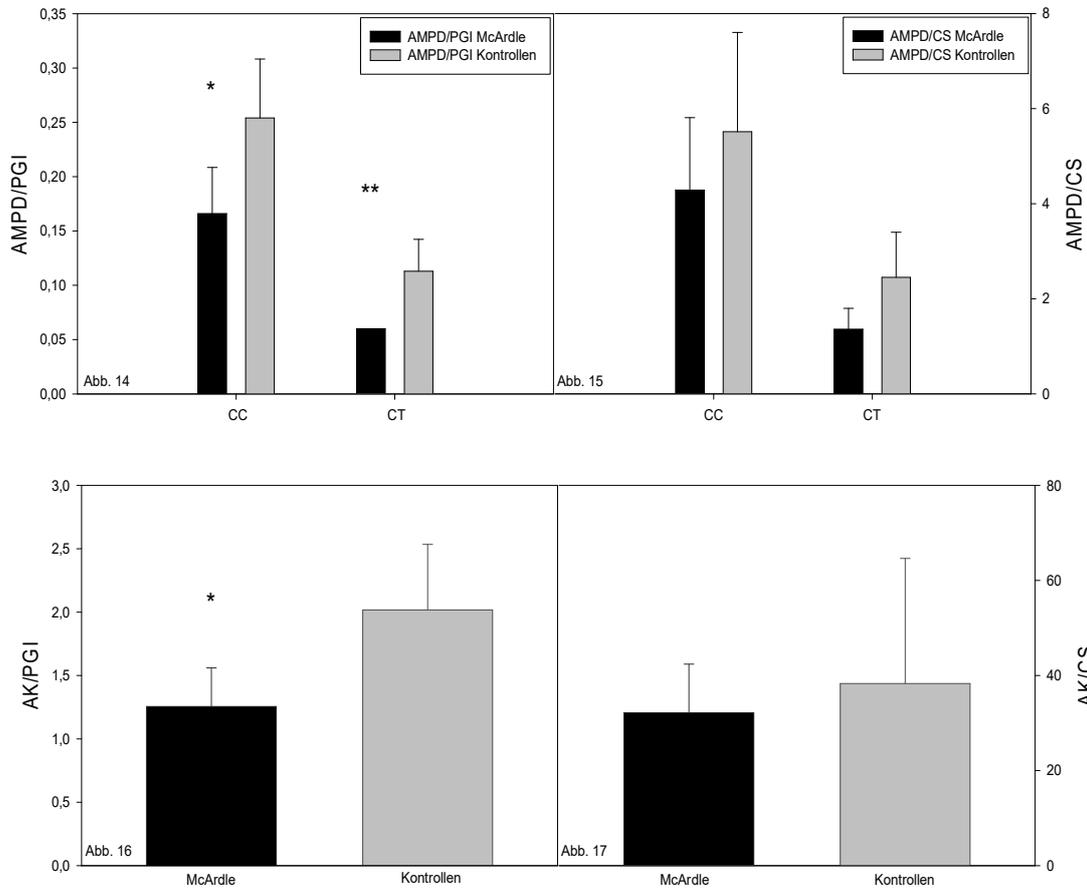


Abb. 14 und 15: AMPD/PGI und AMPD/CS. Dargestellt sind die Quotienten der AMPD- und AK-Aktivitäten im Verhältnis zu den Housekeepingenzymen PGI und CS, separiert nach AMPD1-Genotyp.

Die schwarzen Balken symbolisieren die McArdle-Patienten; die grauen die Kontrollen.

Abb. 16 und 17: AK/PGI und AK/CS. Die Darstellung erfolgt als Gesamtmittelwert der Quotienten. Die im Text genannte Separierung der Quotienten AK/PGI und AK/CS nach AMPD1-Genotyp ist hier nicht abgebildet.

* $p < 0,001$, ** $p = 0,045$. Wo keine Sternmarkierungen abgebildet sind besteht keine statistische Signifikanz.

5.3.5. Einflussnahme des D/I-Polymorphismus auf die Enzymaktivitäten bei McArdle

Im Kapitel 5.2., molekulargenetische Ergebnisse, wird der D/I-Allel-Polymorphismus des ACE-Gens in der Gruppe der McArdle-Patienten untersucht und die Einteilung der Patienten nach diesem Polymorphismus vorgenommen. Da in der Literatur die Einflussgröße dieses Polymorphismus auf verschiedene Aspekte der McArdle-Erkrankung diskutiert wird, erfolgt an dieser Stelle eine erneute Gruppierung der Aktivität aller untersuchten Enzyme unter dem Aspekt des D/I-Polymorphismus.

5 ERGEBNISSE

In der Patientengruppe der Konstellation DD ($n = 3$) betrug der Mittelwert der AMP-Deaminase 312,2 ($\pm 182,0$) U/g NCP und war nicht statistisch signifikant different zu dem mittleren Wert der Patienten des Genotyps DI ($n = 8$) mit 398,9 ($\pm 46,4$) U/g NCP, $p = 0,397$.

Bezüglich der Adenylatkinase lag die mittlere Aktivität bei 2727 ($\pm 1088,5$) U/g NCP in der Gruppe des DD Genotyps vs. 3688,4 ($\pm 1186,7$) U/g NCP, (DI). Der P-Wert 0,254 verneint eine statistische Signifikanz.

Auch die Housekeepingenzyme PGI und CS der McArdle-Homogenate wurden nach der D/I-Allelkonstellation eingeteilt.

Interessanterweise ergab sich für die Phosphoglucoisomerase ein statistisch signifikanter Unterschied zugunsten der Patienten mit einem Insertionsallel: die Enzymaktivität lag mit 2913,7 ($\pm 338,6$) U/g NCP bei den McArdle-Patienten mit einem I-Allel signifikant über dem durchschnittlichen Wert der 3 Patienten des Genotyps DD mit 2140,2 ($\pm 670,7$) U/g NCP; $p = 0,027$ (Abb. 18).

Bezüglich der Citratsynthese waren die Ergebnisse lediglich tendenziell unterschiedlich; hier lag der Mittelwert der Enzymaktivitäten unter den DI-Patienten bei 120,0 ($\pm 27,7$) U/g NCP vs. 90,2 ($\pm 15,5$) U/g NCP (DD), $p = 0,116$ (nicht bildlich dargestellt).

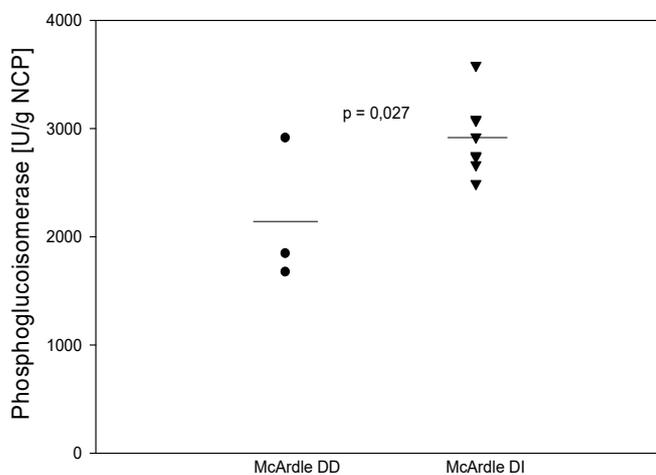


Abb. 18. Einfluss des ACE-Genpolymorphismus auf die mittlere PGI-Aktivität. Die durchgezogenen Linien stellen die Mittelwerte dar. Die Punktsymbole bilden die McArdle-Patienten des ACE-Genotyps DD ab; die Dreiecke symbolisieren die McArdle-Patienten des Genotyps DI. Diese weisen signifikant höhere PGI-Aktivitäten auf.

Eine tabellarische Zusammenfassung aller biochemischen und molekulargenetischen Ergebnisse der Patienten- und Kontrollgruppe befindet sich im Tabellenanhang dieser Arbeit (Tab. 11 und 12).

6. Diskussion

6.1. Der Laktatishämietest

Verschiedene Arbeiten über die McArdle-Erkrankung und deren Pathophysiologie untersuchten die Dynamik der Metabolite des Purin- und Glucosestoffwechsels während und nach muskulärer Arbeit (Rumpf et al., 1981; Mineo et al., 1985, 1987; Coleman et al., 1986; Sinkeler et al., 1986 a; Mineo et al., 1987; Kazemi-Esfarjani, 2002; Gómez-Gallego et al., 2008). In all diesen Arbeiten wurde ein erhöhter Ammoniakanstieg im Blut von McArdle-Patienten nach durchgeführter motorischer Belastung gegenüber Kontrollen gemessen, der von einem 5 – 11 fachen relativen Ammoniakanstieg reichte, während der Referenzwert bei $4 \pm 1,4$ lag (Zierz und Jerusalem, 1991).

Das Merkmal hoher Ammoniakanstiege ist auch bei anderen Krankheiten bekannt, wie z.B. bei den anderen Glycogenose-Typen und den Mitochondriopathien (Coleman et al., 1986); existiert dort jedoch nicht in dem Ausmaß wie bei Patienten der Glycogenose Typ V.

Bei allen in dieser Arbeit aufgeführten LIT-Ergebnissen handelte es sich um simultan erhobene Konzentrationen an Ammoniak und Laktat nach dem Prinzip von Zierz/Jerusalem (1991).

Die signifikant höheren Ammoniakanstiege der 4 getesteten McArdle-Patienten (median 270,4 $\mu\text{mol/l}$ vs. 54,0 $\mu\text{mol/l}$; $p = 0,002$) deckten sich mit den Ergebnissen der oben genannten Arbeiten, wobei die in Literaturangaben erwähnte große Streubreite der Ammoniakwerte sich auch in der vorliegenden Arbeiten in hohen Standardabweichungen niederschlug.

Wie zu erwarten ist, war - der Charakteristik dieser Erkrankung geschuldet - unter den 4 McArdle-Patienten eine Abwesenheit des Laktatanstiegs zu verzeichnen.

6.2. Molekulargenetik

6.2.1. Häufigkeitsverteilung des AMPD1-Genotyps

Die Untersuchung der häufigsten Mutation des AMPD1-Gens ergab unter den 11 Patienten 2 heterozygote Träger einer c.C34T-Mutation (CT) und unter den 27 Kontrollen 7 CT-Individuen. Dies entspricht 18 % bzw. 26 % der jeweiligen Gruppe und deckt sich demnach mit den Angaben der Literatur, in der von ca. 20 % Heterozygoten ausgegangen wird (Norman et al., 2001).

Der homozygote Genotyp (CC), der dem biochemisch nachweisbaren Enzymmangel (MADD) entspricht (Norman et al., 2001; Fischer et al., 2007), lag in der vorliegenden Arbeit weder in der Patienten-, noch in der Kontrollgruppe vor.

Dass im Vergleich der Patienten- mit der Kontrollgruppe ein relevant ungleiches Verhältnis von Heterozygoten (CT) zum Wildtyp (CC) vorlag, schloss der Fisher's Exact Test aus.

6.2.2. Ammoniakanstiege nach AMPD-Genotyp

Nach abgeschlossener molekulargenetischer Untersuchung der Muskelproben auf die AMPD1-Gen-Mutation c.C34T und anschließender Betrachtung der LIT-Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt „AMPD1-Mutation vorhanden / nicht vorhanden“ war interessanterweise ersichtlich, dass die Höhe des Ammoniakanstieges nicht mit dem Genotyp CT bzw. CC korreliert, obwohl der Wildtyp CC in der Patienten- und Kontrollgruppe signifikant höhere Aktivitäten der NH₃-generierenden AMPD aufwies.

Unter den Patienten, von denen LIT-Ergebnisse existierten, lagen die Ammoniakwerte der 3 CC-Individuen zwar ca. 2,5 mal über dem Wert des einen heterozygoten McArdle-Patienten. Aufgrund der sehr geringen Stichprobenmenge kann hier jedoch keine Aussage getroffen werden.

Da normalerweise davon ausgegangen werden kann, dass höhere Enzymaktivitäten auch mit höheren Produktkonzentrationen (hier: Ammoniak) verbunden sind, war das Ergebnis der gleich hohen Ammoniakanstiege der heterozygoten Individuen ein unerwartetes. Es deckt sich jedoch mit der Beobachtung anderer Arbeiten, in denen ebenfalls der Ammoniakanstieg nach muskulärer Arbeit gemessen wurde: Fischer et al. (2007) stellten während 30-sekündiger Ergometersprints fest, dass sich der Ammoniakanstieg im venösen Blut zwar zwischen Männern und Frauen, nicht jedoch zwischen CC- und CT-Individuen unterschied.

Norman et al. (2001) stellten während Hochleistungs-Ergometertests sogar signifikant höhere Ammoniakanstiege heterozygoter Testpersonen fest - trotz relativ geringerer IMP-Konzentrationen im Muskel. Eine mögliche Erklärung hierfür wurde von den Autoren in eben den höheren IMP-Produktion in Muskelzellen des nicht mutierten Wildtyps (CC) gesehen: Sehr hohe IMP-Konzentrationen hemmen das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Purinnukleotidzyklus, die Adenylosuccinatsynthetase. Träger eines mutierten Allels mit damit verbunden verringerten AMPD-Aktivitäten und folglich niedrigerer Konzentration an IMP hätten nach dieser Theorie demzufolge eine höhere „Durchlaufrate“ des PNZ, was sich in einer höheren NH₃-Produktion niederschlägt.

Diesen Beobachtungen entgegen wies eine Ergometer-Studie von Rubio et al. (2008) erniedrigte Ammoniakanstiege bei CT-McArdle-Patienten (im Vergleich mit CC-Patienten) auf, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass bei Glycogenose-Patienten eine Beeinflussung des Ammoniakanstieges durch den AMPD1-Genotyp existieren könnte.

Zusammengefasst lässt sich schlussfolgern, dass der AMPD-Genotyp bei gesunden Testpersonen hinsichtlich der Genotypen CT und CC nicht mit der Höhe der im venösen Blut erreichten Ammoniakkonzentrationen korreliert. Die Ergebnisse von Rubio et al. (2008), die eine Existenz dieser Korrelation bei McArdle-Patienten nahelegen, werden durch die

Beobachtungen der vorliegenden Arbeit unterstützt, jedoch sind für die Ermittlung eines aussagekräftigen Ergebnisses höhere Patientenzahlen notwendig.

6.2.3. Der D/I-Polymorphismus der McArdle-Patienten

Diverse Arbeiten beschäftigten sich bereits mit der großen klinischen Variabilität der Glycogenose Typ V, und einige Arbeitsgruppen untersuchten mögliche Auswirkungen des Polymorphismus des ACE-Gens auf die Leistungsfähigkeit und auf besondere phänotypische Merkmale von McArdle-Patienten, wie die maximale Sauerstoffaufnahme und die subjektiv empfundene Schwere der Symptomatik (Martinuzzi et al., 2003; Paradas et al., 2005; Rubio et al., 2007, Gómez-Gallego et al., 2008).

Individuen des Genotyps DD weisen ca. doppelt so hohe ACE-Spiegel auf wie Menschen des II-Genotyps (Cambien et al., 1992). Neben einer „Schutz-Funktion“ des I-Allels auf das Herzkreislaufsystem wird die Beeinflussung anderer Enzyme, zum Beispiel des Glucosestoffwechsels, durch den ACE-Genpolymorphismus diskutiert (Cambien et al., 1992, Gómez-Gallego, 2008).

Vor diesem Hintergrund erfolgte in dieser Arbeit die Bezugnahme der hier untersuchten Enzyme AMPD, AK, PGI und CS auf die Allelkonstellation des ACE-Gens innerhalb der Patientengruppe.

8 der 11 Patienten wiesen den Genotyp DI auf; 3 Patienten waren homozygot für das Deletionsallel. Patienten mit 2 I-Allelen waren nicht darunter. Die Allelfrequenz des Deletionsallels betrug somit 0,64, die des Insertionsallels 0,36. Das entspricht in etwa den Angaben in der Literatur, in der von einer D-Allelfrequenz von ca. 60 % und einer I-Allelfrequenz von ca. 40 % ausgegangen wird (Gómez-Gallego et al., 2008).

6.3. Biochemie

6.3.1. AMP-Deaminase

Das Enzym ist physiologischerweise relativ großen Adaptationsvorgängen unterworfen: abgesehen von der unterschiedlichen Expression der verschiedenen Isoenzyme in den Geweben und Organen ist die Enzymaktivität besonders hoch in Geweben mit hohem ATP-Umsatz und niedriger oxidativer Kapazität. Dies ist bei Muskelkrankheiten der Fall, aber auch physiologischerweise in Muskeln mit einem großen Anteil an Typ IIB-(fast glycolytic)-Muskelfasern.

Die Muskeln von Glycogenose-Patienten weisen gewisse Parallelen auf zu Muskeln mit großem Typ IIB-Muskelfaseranteil, insbesondere die eingeschränkte oxidative Kapazität. Typ IIB-Muskelfasern weisen eine größere ADP-Akkumulation mit höherem ATP-Umsatz, sowie höhere Ammoniakanstiege auf (Meyer und Terjung, 1979; Whitlock und Terjung, 1987).

6 DISKUSSION

Sollte die höhere Ammoniakproduktion, die in den Typ II-Muskelfasern auf die höheren Vorkommen von AMPD-mRNA zurückgeführt wird, bei den McArdle-Patienten ebenfalls auf einer Enzyminduktion beruhen?

Diese Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit erstmals untersucht werden.

Ähnlich den Ergebnissen anderer Autoren (Norman et al., 1995, 1998; Hanisch et al., 2008) spiegelte sich sowohl in den spektralphotometrischen Messergebnissen der Patienten, als auch in denen der Kontrollen das Vorhandensein einer AMPD1-Genmutation wider: die Enzymaktivität der heterozygoten Individuen betrug im Mittel 44,2 % der AMPD-Aktivität des Wildtyps bei den Kontrollen bzw. 30,8 % bei den Patienten.

Im Gegensatz zu der Arbeit von Hanisch et al. (2008) wiesen die Gruppen „CC“ (homozygoter Wildtyp) und „CT“ (heterozygot für ein mutiertes AMPD1-Allel) trotz großer Streubreite der Enzymaktivität in der Bevölkerung (Norman et al., 1995; Hanisch et al., 2008) keine Überlappungen auf, wie es in Abbildung 19 illustriert ist.

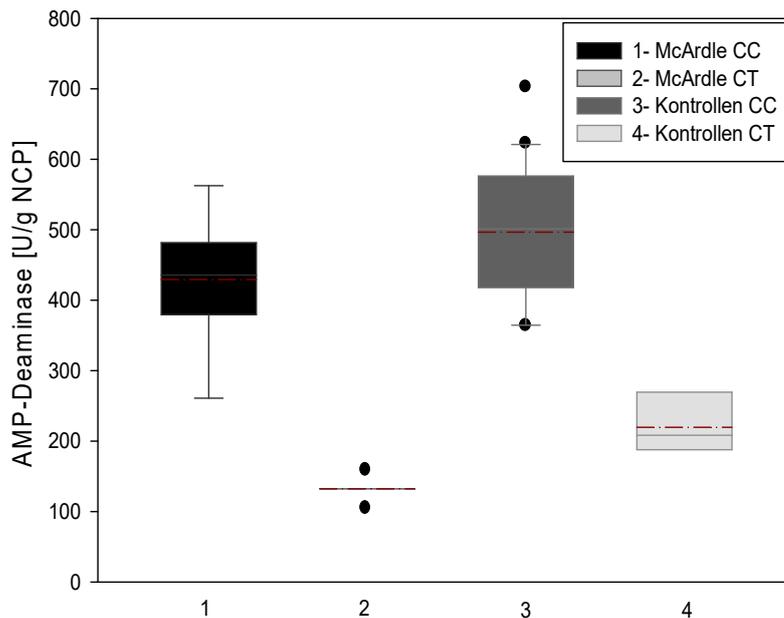


Abb. 19 Boxplotdarstellung zur Verdeutlichung der sich nicht überlappenden Enzymaktivitäten der CC- und CT Individuen. Die unterbrochenen Linien symbolisieren die Mittelwerte; die durchgezogenen die Mediane. Da nur 2 heterozygote McArdle-Patienten existieren, sind diese durch die beiden Punkte dargestellt. Die letzte Box ist aufgrund der dafür erforderlichen Datenmenge ohne „Whiskers“ abgebildet (nur 7 CT-Kontrollen).

6 DISKUSSION

Die Kernaussage der Ergebnisse, welche die Theorie einer Enzyminduktion widerlegen, ist jedoch, dass die AMPD-Aktivitäten weder der CC- noch der CT-McArdle-Patienten über den Vergleichswerten der Kontrollgruppen lagen.

Dass in der Patientengruppe eine höhere Konzentration an mRNA trotz nicht erhöhter Enzymaktivität der AMPD vorliegt, ist, wenn auch durch die Möglichkeit posttranskriptioneller Faktoren nicht ausgeschlossen, so doch unwahrscheinlich, denn die Konzentrationen an mRNA und Protein decken sich in der Literatur mit den Enzymaktivitäten (Wheeler und Lowenstein, 1979; Lowenstein, 1990; Hanisch et al., 2006).

Das in dieser Arbeit existierende Verhältnis Frauen-zu-Männern lag unter den Patienten bei 7 : 4 und unter den Kontrollen bei 10 : 17. Ob tatsächlich eine geschlechtsabhängige Enzymexpression existiert, wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Die Enzymaktivität liegt bei Frauen laut Norman et al. (1998) durchschnittlich 10 - 15 % unter der männlicher Individuen. Hanisch et al. (2008) konnten die genannten Geschlechtsunterschiede jedoch nicht nachweisen. Die Tatsache, dass der weibliche Anteil unter den McArdle-Patienten in der vorliegenden Arbeit höher ist, lässt also, sollte der Geschlechtfaktor das Ergebnis beeinflussen, bezüglich der AMPD-Aktivitäten der Patienten eher noch eine Korrektur nach unten erwarten, obwohl der Proportionalitätsunterschied w/m zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe nicht signifikant ist (Fisher's Exact Test).

In Anbetracht der oben genannten Parallelen und Unterschiede zwischen dem Muskelstoffwechsel von McArdle-Patienten und physiologischen Adaptationsvorgängen ließ sich vor der Durchführung dieser Arbeit keine Voraussage treffen bezüglich der Enzymaktivitäten der AMP-Deaminase und der Adenylatkinase im phosphorylasedefizienten Muskel.

Die Hypothese einer Enzyminduktion wurde gestützt durch die Tatsache, dass die AMP-Deaminase ein Enzym ist, dessen Expression und Aktivität durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird, z.B. durch die Gewebeart: die Enzymaktivität ist im Skelettmuskel - dem Gewebe der scheinbar höchsten Kapazität für Adaptationsvorgänge (Huber et al., 2007) - weitaus höher als in anderen Geweben (Meyer und Terjung, 1979; Sabina et al., 1984).

Zudem spielen andere Einflussfaktoren wie das Geschlecht, die Muskelfasertypverteilung und auch der körperlichen Trainingszustand (Norman et al., 1998) eine Rolle bei der Höhe der Enzymaktivität und der genetischen Regulierung der AMPD, was die Vermutung nahe legte, dass auch die höhere Ammoniak-Produktion in der phosphorylasedefizienten Skelettmuskulatur der McArdle-Patienten auf einer Enzyminduktion der AMP-Deaminase beruht. Die oben diskutierten Ergebnisse widerlegen diese Hypothese.

6.3.2. Adenylatkinase

Die Tatsache einer 5-fach höheren Konzentration der Adenylatkinase in Typ II-Fasern (Fishbein, 1985) mit einem hohen ATP-Umsatz- und Verbrauch weist auf die Bedeutung der AK als alternativer Energieerzeuger hin.

Die Arbeit von Hancock et al. (2005) stützt die Hypothese, dass sowohl die AK als auch die AMP-Deaminase eine wichtige Funktion in der Beseitigung der während Muskularbeit auftretenden ADP-Akkumulation besitzen: in adenylatkinasedefizienten Mäusemuskeln war die beobachtete Akkumulation an ADP nach stimulierten Kontraktionen wesentlich höher als in Kontrollen, wobei die Menge an produziertem IMP hingegen deutlich geringer ausfiel. Diese Beobachtung weist auf die enge funktionale Kopplung der AK- mit der AMPD-Reaktion hin.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten dementsprechend, dass sich auch die durchschnittlichen Enzymaktivitäten der AK bei den McArdle-Patienten nicht signifikant unterschieden von dem Ergebnis der Kontrollgruppe ($p = 0,644$).

Während in der Kontrollgruppe kein Unterschied zwischen Individuen ohne (CC) und mit (CT) AMPD1-Mutation bezüglich der Adenylatkinase-Aktivitäten bestand, ergab die Aufteilung der McArdle-Patienten einen mittleren Wert von 3633,2 ($\pm 1135,6$) U/g NCP in der CC- und 2494,4 ($\pm 1343,6$) U/g NCP in der CT-Gruppe. Der p-Wert verneint mit 0,241 eine Signifikanz. Abgesehen davon, dass eine statistisch verwertbare Aussage aufgrund der geringen Stichprobenmenge nicht zu treffen ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass hier ein Fehler der 2. Art vorliegt und in Wirklichkeit, würden mehr Messergebnisse vorliegen, ein relevanter Unterschied besteht. Dies würde bedeuten, dass bei McArdle-Patienten, die ein mutiertes AMPD1-Allel aufweisen, die Aktivität der mit der AMPD funktionell gekoppelten AK ebenfalls erniedrigt ist.

6.3.3. Die Housekeepingenzyme Phosphoglucoisomerase und Citratsynthase

Die Aktivität der Phosphoglucoisomerase, einem Schlüsselenzym der Glycolyse, erwies sich in den Homogenaten der Patienten als statistisch signifikant höher ($p < 0,001$). Auch die mittlere Aktivität des ausschließlich in Mitochondrien vorkommenden Marker-Enzyms Citratsynthase war in den Muskelproben der Patienten signifikant erhöht ($p = 0,014$).

Bezüglich der Citratsynthase besteht die Möglichkeit einer unspezifischen Erhöhung der Mitochondrienanzahl, wie sie auch in den Muskelbiopsien von Patienten anderer neuromuskulärer Erkrankungen beobachtet wird (Krasnianski et al., 2005).

Die höheren Aktivitäten der Housekeepingenzyme können jedoch auch auf Adaptationsvorgänge bei McArdle-Patienten hinweisen:

Mit dem Anfluten von Glucose aus der Blutbahn wird eine gewisse Kompensation der beeinträchtigten Glycogenolyse erreicht (Vissing und Haller, 2003), was sich auch darin widerspiegelt, dass die Glucoseaufnahme während muskulärer Arbeit bei McArdle-Patienten höher ist als bei gesunden Kontrollen (Haller und Vissing, 2002).

Die in dieser Arbeit erstmals dargestellte höhere PGI-Aktivität bei Patienten der Glycogenose V ergänzt die Erklärungsansätze zur Genese des „Second wind“-Phänomens: höhere Vorkommen des glykolytischen Enzyms könnten als zusätzlicher Ausgleichsversuch der defizitären Glycogenaufspaltung gewertet werden.

Dass dieses Kompensationsmechanismus das Defizit der oxidativen Kapazität bei McArdle-Patienten jedoch letztendlich nicht decken kann, zeigen verringerte VO_2 max-Werte, die bei Glycogenosepatienten während sportlicher Übungen gemessen wurden (Haller und Vissing, 2002; Ørngreen et al., 2009) und die ein herabgesetztes Transportvermögen von Sauerstoff aus der Atemluft in die Arbeitsmuskulatur repräsentieren. Da Hypoxie die Expression glykolytischer Enzyme, unter anderem der PGI, induziert (Funasaka et al., 2005), könnte darin ebenfalls eine Erklärung für die höheren PGI-Aktivitäten im phosphorylasedefizienten Muskel liegen.

Die höhere CS-Aktivität kann auch auf eine kompensatorische Vermehrung der Zellorganellen, die die Zellatmung in Form von Citratzyklus und oxidativer Phosphorylierung umsetzen, hindeuten. Der Anstieg an freien Fettsäuren sowie deren Verbrennung während muskulärer Arbeit ist bei McArdle-Patienten zum Zeitpunkt des Eintretens des „Second wind“ höher als bei gesunden Kontrollen, was impliziert, dass die Mobilisierung und Verstoffwechslung dieser zur Pathophysiologie des klinischen Phänomens des „Second wind“ ebenfalls beitragen (Ørngreen et al., 2009).

Zudem werden die Enzyme des Citratzyklus durch ADP aktiviert (Hansford, 1980; Sahlin et al., 1995), von dem angenommen wird, dass es in phosphorylasedefizienten Muskeln während muskulärer Arbeit stärker ansteigt (Radda, 1986; Sahlin et al., 1995).

6.3.4. Bezugnahme der AMPD und AK auf die Housekeepingenzyme

Neben den rein auf das Gramm Feuchtgewicht beziehungsweise Gramm Protein bezogenen Enzymaktivitäten - im Ergebnisteil dieser Arbeit sind der Relevanz wegen nur die auf das Protein bezogenen Messwerte dargestellt - erfolgte die Berechnung der Quotienten AMPD/CS und AMPD/PGI:

Bezogen auf die Citratsynthase ist die Gesamtaktivität der AMPD der McArdle-Patienten nicht signifikant verschieden von den Kontrollen ($p = 0,221$).

Es besteht jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied für das Verhältnis AMPD/PGI: dieses lag bei den Kontrollen 1,5 fach über dem der Patienten ($p = 0,011$).

Der Grund für die signifikante Verringerung der AMPD-Aktivität bezogen auf das Housekeepingenzym PGI ist der signifikant höheren mittleren PGI-Aktivität der McArdle-Patienten geschuldet.

Bei der Adenylatkinase lag der Quotient AK/PGI bei den Patienten ebenfalls signifikant unter dem der Kontrollen ($p < 0,001$); für die Berechnung von AK/CS ergab sich lediglich eine Tendenz in dieselbe Richtung ($p = 0,058$). Auch hier liegen diesem Ergebnis die höheren absoluten Enzymaktivitäten der PGI unter den McArdle-Patienten, bezogen auf das Gramm nichtkollagenes Protein, zugrunde.

6.3.5. Erklärungsansätze für die hohe NH_3 -Produktion bei McArdle

Im Folgenden sollen die prinzipiellen Möglichkeiten, die der hohen Ammoniakproduktion bei McArdle-Patienten zugrunde liegen können, genannt und im Kapitel 6.4., Schlussfolgerung, diskutiert werden.

Vor dem Hintergrund der 4 verschiedenen Mechanismen der Enzymregulierung (1. höhere Substraverfügbarkeit, 2. Veränderung der Substrataffinität, 3. Veränderung der katalytischen Aktivität, 4. Enzyminduktion), sind folgende Szenarien denkbar:

Aufgrund der höheren Konzentration an ADP im arbeitenden, phosphorylasedefizienten Muskel wird auch von höheren AMP-Spiegeln ausgegangen (Sahlin et al., 1986; Radda, 1986; De Stefano et al., 1996). Somit ist die Annahme naheliegend, dass die hohen Ammoniakspiegel bei McArdle-Patienten im Sinne der Autoregulation auf einer hohen Enzymsättigung beruhen, da AMP das Substrat der NH_3 -generierenden AMPD ist.

Das besondere Milieu in einer phosphorylasedefizienten Muskelzelle im ischämischen Zustand macht zudem eine Änderung der kinetischen Eigenschaften der AMPD denkbar:

Die pathognomonische Auffälligkeit bei Glycogenose-Patienten ist der fehlende Anstieg von Laktat. Laktat jedoch führt zu einer Ansäuerung des Milieus, weshalb der pH-Wert in der Muskulatur von Patienten der Glycogenose Typ V höher ist, was neben der mangelhaften Laktatproduktion auch auf den erhöhten, protonenkonsumierenden Abbau von Creatinphosphat zurückgeführt wird (Radda, 1986; Kazemi-Esfarjani et al., 2002).

Das Laktat, die Protonen und der pH-Wert werden wiederum jedoch als entscheidende Aktivierungsfaktoren der AMP-Deaminase diskutiert, die den Muskeln der McArdle-Patienten fehlen; denn die Substrataffinität, ausgedrückt durch die Michaelis-Menten-Konstante, ist u.a. abhängig vom pH-Wert (Lowenstein, 1990).

6 DISKUSSION

Die AMPD wird durch verschiedene Metabolite allosterisch beeinflusst, z.B. gilt Kalium als essentiell aktivierender Faktor der AMP-Deaminase. So schwächt es die inhibitorische Wirkung durch GTP und ATP. Bei McArdle-Patienten werden höhere Kaliumserumspiegelwerte gemessen (Martinuzzi et al., 2003).

Wie weiter oben ausgeführt ist die AMP-Deaminase physiologischen Adaptationsvorgängen unterworfen. Verschiedene Faktoren wie Muskelfaserart und Trainingsstatus werden als einflussgebend auf die Proteosynthese der AMPD diskutiert. Diese letzte Möglichkeit der 4 Stoffwechselregulationswege, die Enzyminduktion, wurde jedoch durch die vorliegende Arbeit widerlegt.

Neben der Reaktion der AMP-Deaminase existieren in der Skelettmuskulatur zudem weitere Reaktionen, bei denen Ammoniak freigesetzt wird: Alternativer Abbauweg des AMP ist die Abspaltung von Phosphat, wobei Adenosin entsteht, katalysiert durch die cytosolische 5'-Nukleotidase (dargestellt in Abb. 1, Einleitung). Die weitere Degradation des Adenosins lässt Inosin entstehen. Bei diesem Schritt erfolgt ebenfalls die Freisetzung von 1 Molekül Ammoniak.

Da Adenosin gefäßdilatorisch wirkt, könnten die lokal beobachtete höhere Blutflussrate und die „hyperkinetische zirkulatorische Antwort“ (Kazemi-Esfarjani et al., 2002) auf Muskularbeit, die bei McArdle-Patienten beobachtet wird, theoretisch mit einer höheren Adenosinfreisetzung aus phosphorylasedefizienten Muskeln zusammenhängen; ähnlich der von Norman et al. (2001) getätigten Beobachtungen bei Patienten mit einem AMP-Deaminasemangel (MADD). Während Norman et al. (2001) jedoch wesentlich höhere Adenosinspiegel im nach Arbeit entnommenen MADD-Muskel maßen, haben Sinkeler et al. (1986b) in ihrer Arbeit weder für MADD- noch für McArdle-Patienten höhere Adenosinserumspiegel messen können.

Eine andere Entstehungsmöglichkeit von Ammoniak im arbeitenden Muskel ist der Abbau von Aminosäuren. Es gibt Hinweise darauf, dass dieser Weg bei McArdle-Patienten in höherem Maße in Anspruch genommen wird als bei Patienten mit physiologischem Kohlenhydratstoffwechsel: Wagenmakers et al. (1990) postulierten, dass die Rate an freigesetztem Ammoniak den Abbau von AMP zu IMP übersteigt und somit nicht hauptsächlich aus dem Purinabbau stammen kann, sondern der Deamination von Aminosäuren entweder über die Glutamatdehydrogenasereaktion oder den Purinnukleotidzyklus entspringt, in dem über die eingangs genannten Enzyme AMP-Deaminase, Adenylosuccinatsynthetase und Adenylosuccinatlyase die Aminosäure Aspartat unter der Entstehung von Fumarat eingeht. Laut der Hypothese der Autoren führt der übermäßige Verbrauch von α -Ketoglutar Säure, welche für

die meisten Transaminierungsvorgänge benötigt wird, zu einem Defizit im Citratzyklus. Dies könnte zu der herabgesetzten oxidativen Kapazität und Leistungsfähigkeit der Glycogenose-Patienten beitragen. Gestützt wird diese Theorie dadurch, dass der Anstieg von Ammoniak bei McArdle-Patienten nach Zufuhr von (verzweigkettigen) Aminosäuren noch gesteigert wird (Wagenmakers et al., 1990).

6.3.6. Einflussnahme des D/I-Polymorphismus auf die Enzymaktivitäten bei McArdle

Der Mittelwert der PGI-Aktivitäten lag mit geringer statistischer Signifikanz ($p = 0,027$) in der Gruppe der 8 Patienten mit einem Insertionsallel (DI) über dem der 3 Patienten mit einer DD-Allelkonstellation.

Bezüglich der CS zeigte die mittlere Enzymaktivität keine Abhängigkeit von der D/I-Allelkonstellation.

Die höheren PGI-Aktivitäten unter den Patienten der ACE-Genkonstellation DI sprechen für die von Gómez-Gallego et al. (2008) vertretene Theorie, dass die positive Auswirkung der I-Allelfrequenz auf die phänotypischen Eigenschaften von (McArdle)-Patienten mit einer Adaptation glykolytischer Enzyme in Zusammenhang stehen könnte.

Ein besonderes Interesse würde dem Vergleich der im Laktat-Ischämietest erhobenen Werte zukommen. Da der Ammoniakwert als direkter Marker des Energiestatus angesehen wird (Wagenmakers et al., 1990) wäre eine positive Korrelation der Höhe des Ammoniakanstieges mit der D-Allelfrequenz denkbar. In der vorliegenden Arbeit waren die Fallzahlen zu gering für eine statistische Auswertung (es lagen nur von 4 McArdle-Patienten LIT-Ergebnisse vor).

Da die Diskussionen bezüglich der klinischen Variabilität der McArdle-Myopathie und der Relevanz des ACE-Gen-Polymorphismus, auch bei anderen Krankheiten, noch nicht abgeschlossen sind, wäre eine Intensivierung solcher Untersuchungen denkbar, wünschenswerterweise unter Einbezug von Patienten des Genotyps II.

6.4. Schlussfolgerung

Das pathognomonische Ergebnis der McArdle-Patienten im Laktat-Ischämietest - der einerseits fehlende Laktatanstieg und andererseits überhöhte Ammoniakanstieg - ist bezüglich des Laktats zweifelsfrei auf die fehlende Expression des Enzyms Myophosphorylase zurückzuführen. Dass die enorme Ammoniakfreisetzung im (ischämisch) arbeitenden Muskel dieser Patienten jedoch auf eine veränderte Expression - eine Enzyminduktion - der AMP-Deaminase zurückzuführen ist, widerlegt diese Arbeit.

6 DISKUSSION

Da noch andere Reaktionen im arbeitenden Muskel existieren, bei denen Ammoniak freigesetzt wird, sind diese als Quelle der höheren Ammoniakproduktion in phosphorylasedefizienten Muskeln grundsätzlich nicht ausgeschlossen.

Eine Induktion bzw. höhere Aktivität der cytosolischen 5'-Nukleotidase und Adenosin-Deaminase, welche AMP zunächst unter Abspaltung von Phosphat zu Adenosin und schließlich unter Freisetzung von Ammoniak zu Inosin abbauen, ist prinzipiell möglich. Da jedoch die Affinität der AMP-Deaminase viel höher ist für das Substrat AMP als die der 5'-Nukleotidase (Hanisch et al., 2006) ist eine größere Bedeutung dieses alternativen Abbauweges eher wenig wahrscheinlich. Adenosin wirkt gefäßerweiternd (Norman et al., 2001); die beobachteten höheren Blutflussraten bei McArdle-Patienten, die auf eine Gefäßdilatation zurückgeführt werden (Kazemi-Esfarjani et al., 2002), können jedoch ebenso auf den höheren extrazellulären Kaliumspiegeln (Haller et al., 1997; Martinuzzi et al., 2003) beruhen. Zudem sind bisher keine höheren Adenosinspiegel bei McArdle-Patienten gemessen worden. Messungen der Enzymaktivitäten der cytosolischen 5'-Nukleotidase und der Adenosindeaminase sowie möglicherweise enzymkinetische Untersuchungen zum Ausschluss veränderter Substratbindungsaffinitäten bei McArdle-Patienten, die hinsichtlich der pH-Wert-Differenzen durchaus möglich sind, wären im Rahmen weiterer Forschung denkbar.

Des Weiteren existiert die Hypothese des gesteigerten Aminosäurenstoffwechsels bei McArdle-Patienten als Hauptquelle des Ammoniaks (Wagenmakers et al., 1990). Die diesbezüglich unterstützenden Argumente umfassen neben der Beobachtung einer Steigerung der Ammoniakfreisetzung nach Gabe von verzweigt-kettigen Aminosäuren auch die im Vergleich mit Hypoxanthin, einem Abbauprodukt des IMP, circa 20-fach höheren Ammoniakanstiege. Zudem dürfte der hohe pH-Wert der McArdle-Patienten nach Muskelarbeit die Aktivierung der AMP-Deaminase behindern, deren pH-Optimum im sauren Milieu liegt.

Somit sind alternative Wege der Genese der Ammoniakfreisetzung prinzipiell denkbar und können zukünftig, gerade hinsichtlich der noch nicht abgeschlossenen Diskussion über die Bedeutung des Enzyms AMP-Deaminase, zu weiterer Forschung veranlassen.

Dass die hohe Ammoniakproduktion während Muskelarbeit bei McArdle-Patienten jedoch auf die AMP-Deaminase zurückgeht, ist derzeit die am ehesten nachvollziehbare Hypothese. Das in phosphorylasedefizienten Muskeln höher konzentrierte ADP (Radda, 1986; Sahlin et al., 1995) ist der stärkste Aktivator der AMP-Deaminase (Lowenstein, 1990). Zudem wurden bei McArdle-Patienten weitaus höhere Konzentrationen an Inosin und Hypoxanthin gemessen als bei gesunden Kontrollen (Mineo et al., 1985; Sinkeler et al., 1986b; Heller et al., 1988). Dies

6 DISKUSSION

sind Abbauprodukte des IMP, welches wiederum als Hauptprodukt aus der Reaktion der AMPD hervorgeht.

Kazemi-Esfarjani et al. (2002) untersuchten McArdle-Patienten auch hinsichtlich ihres AMPD-Genotyps. Dass alle Glycogenose-Patienten einen signifikant höheren NH_3 -Anstieg aufweisen bis auf einen, der einen AMPD-Mangel aufweist, bestärkt die Hypothese, dass das gebildete Ammoniak aus der Reaktion der AMP-Deaminase hervorgeht.

Die Tatsache, dass Skelettmuskelzellen den höchsten Gehalt an AMP-Deaminase aufweisen (Meyer und Terjung, 1979; Sabina et al., 1984), unterstreicht das Gewicht des Enzyms im Energiehaushalt des Muskels. Wenn auch der Mangel dieses Enzyms bei den meisten Menschen nicht klinisch in Erscheinung tritt, so mag es bei Patienten der McArdle-Myopathie als entscheidender Kompensationsmechanismus für den Abbau des verstärkt anfallenden AMP und ADP fungieren, was die von Rubio et al. (2008) herabgesetzte Leistungsfähigkeit weiblicher McArdle-Patienten mit einem mutierten AMPD1-Allel erklären könnte.

Letztendlich stellen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine weitere Annäherung an das Verständnis der komplexen Pathophysiologie der McArdle-Erkrankung dar, können jedoch, wie die gesamte bisherige Forschung, nicht endgültig klären, in wieweit ein in Folge der defizitären Glycogenolyse gestörter Energiehaushalt mit derangiertem Purinmetabolismus die Hauptrolle in der Pathophysiologie dieser Erkrankung spielt oder vornehmlich andere Faktoren zur Symptomverursachung beitragen, wie beispielsweise Alterationen der sarkolemmalen Na-K-ATPase, eine Beeinträchtigung der Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums oder der die Aufspaltung der CrP-Vorräte behindernde vergleichsweise hohe pH-Wert bei McArdle-Patienten (Lucia et al., 2008).

7. Zusammenfassung

Die Glycogenose Typ V, auch McArdle-Erkrankung genannt, ist charakterisiert durch eine Mutation des PYGM-Gens, welches für das muskuläre Isoenzym der Phosphorylase codiert. Die Phosphorylase spaltet die im Muskel gespeicherten Glycogenvorräte auf und macht die aus der Aufspaltung resultierenden Untereinheiten - die Glucosemoleküle - somit verfügbar für den energieliefernden Vorgang der Glycolyse.

Aus dem autosomal rezessiv vererbten Gendefekt resultiert demzufolge eine insuffiziente Glycolyse. Dies spiegelt sich wider in der Abwesenheit des normalerweise während muskulärer Arbeit beobachteten Anstiegs des Serumlaktatspiegels.

Daneben existiert eine weitere paraklinische Besonderheit in diesem Patientenkollektiv: der in der Literatur häufig beschriebene übergroße Anstieg des Ammoniakserumspiegels während muskulärer Arbeit.

Dieses Merkmal gab in dieser Arbeit Anlass zur Untersuchung der dafür mutmaßlich verantwortlichen Enzyme. Dies sind die AMP-Deaminase und die Adenylatkinase. Die durch letztere katalysierte Reaktion setzt neben dem Produkt ATP auch AMP frei, welches durch die AMP-Deaminase zu IMP und Ammoniak abgebaut wird, wodurch das Gleichgewicht der Adenylatkinase-Reaktion zu Gunsten der ATP-Entstehung verlagert wird. Hauptverantwortlich für die mit muskulärer Arbeit unweigerlich verbundene Ammoniakentstehung ist also die Reaktion, die durch die AMP-Deaminase katalysiert wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zur Klärung des Stellenwertes der in ihrer Bedeutung viel diskutierten Enzyme AMP-Deaminase und Adenylatkinase beizutragen und zu untersuchen, ob eine Induktion eines der beiden Enzyme, die sich in einer höheren Enzymaktivität ausdrückt, Grundlage der hohen Ammoniakanstiege bei Patienten der Glycogenose Typ V ist.

Spektralphotometrisch wurden die Enzymaktivitäten der AMP-Deaminase und Adenylatkinase in Muskelhomogenaten von 11 McArdle-Patienten und 27 Kontrollen bestimmt. Als Bezugspunkte dienten die ebenfalls in Muskelhomogenaten photometrisch ermittelten Aktivitäten der Housekeeping-Enzyme Phosphoglucoisomerase und Citratsynthase. Bezüglich der Adenylatkinase-Bestimmung war zunächst eine Testetablierung notwendig.

Die sich anschließenden molekulargenetischen Untersuchungen basierten auf der PCR-Technik.

Innerhalb der Gruppe der McArdle-Patienten und der Kontrollen zeichneten sich während der Bestimmung der AMPD-Aktivitäten 2 sich nicht überlappende Untergruppen ab.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Wie sich durch die anschließende molekulargenetische Identifizierung der AMPD1-Genmutation nachvollziehen ließ, waren unter den McArdle-Patienten 2 und unter den Kontrollen 7 für die AMPD1-Mutation Heterozygote (CT), welche signifikant geringere AMPD-Aktivitäten aufwiesen. Die restlichen 9 McArdle-Patienten und 20 Kontrollen entsprachen dem AMPD1-Wildtyp (CC).

Die Aktivitäten der AMPD wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen CC-Patienten- und CC-Kontrollen auf. Auch wichen die Enzymaktivität der für die AMPD1-Mutation heterozygoten McArdle-Patienten und heterozygoten Kontrollen nicht signifikant voneinander ab. Das gleiche galt für die Adenylatkinase: auch hier lag die Enzymaktivität der McArdle-Patienten nicht über den Kontrollwerten.

Zusammengefasst war somit die Hypothese, dass die hohe Ammoniakproduktion in (arbeitenden) Muskeln von McArdle-Patienten auf eine Enzyminduktion zurückzuführen ist, widerlegt.

Im Gegensatz dazu lagen interessanterweise jedoch sowohl die Aktivität der Phosphoglucoisomerase als auch der Citratsynthase in den Muskelhomogenaten der McArdle-Patienten statistisch signifikant über den Kontrollwerten.

Diese Ergebnisse weisen auf Adaptationsvorgänge bei McArdle-Patienten hin.

Daneben erfolgte die molekulargenetische Untersuchung der McArdle-Patienten auf den Deletions-Insertions-Polymorphismus des ACE-Gens. Dieser Genpolymorphismus wird als einflussgebend auf die phänotypische Ausprägung der McArdle-Erkrankung diskutiert. 3 McArdle-Patienten wiesen den DD- und 8 Patienten den DI-Genotyp auf. Der seltene Genotyp II kam in der Patientengruppe nicht vor. Bei Betrachtung der Enzymaktivitäten vor dem Hintergrund des ACE-Genotyps innerhalb der McArdle-Patientengruppe konnte eine positive Korrelation zwischen dem I-Allel und der Aktivität des glycolytischen Enzyms PGI nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels biochemischer und molekulargenetischer Methoden weiterer Aufschluss über die Glycogenose Typ V erlangt werden.

Die noch andauernde wissenschaftliche Diskussion über die Bedeutung der hier untersuchten Enzyme AMP-Deaminase und Adenylatkinase stellt einen weiteren Aktualitätsbezug dieser Arbeit dar:

Die gewonnenen Erkenntnisse über das besondere Merkmal der hohen Ammoniakproduktion in den Muskeln der McArdle-Patienten können weiterer Forschung hinsichtlich der Stellung der AMP-Deaminase im Muskelstoffwechsel als Grundlage dienen.

8. Literaturverzeichnis

Argov Z, Bank WJ, Maris J, Chance B: Muscle energy metabolism in McArdle's syndrome by in vivo phosphorus magnetic resonance spectroscopy *Neurol* 37 (1987) 1720-1724

Ashby B, Frieden C, Bischoff R: Immunofluorescent and histochemical localization of AMP Deaminase in skeletal muscle *J Cell Biol* 81 (1979) 361-73

Bergmeyer, H.-U.: *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim FRG, Vol. 1, 1974

Braakhekke JP, deBruin MI, Stegeman DF, Wevers RA, Binkhorst RA, Joosten EMG: The second wind phenomenon in McArdle's disease. *Brain* 109 (1986) 1087-1101

Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F: Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359 (1992) 641-644

Chiang FT, Hsu KL, Chen WM, Tseng CD, Tseng YZ: Determination of angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms: stepdown PCR increases detection of heterozygotes. *Clin Chem* (44) 1998 1353-1356

Coleman RA, Stajich JM, Pact VW, Pericak-Vance MA: The ischemic exercise test in normal adults and in patients with weakness and cramps. *Muscle Nerve* 9 (1986) 216-221

De Palma S, Ripamonti M, Vigano A, Moriggi M, Capitanio D, Samaja M, Milano G, Cerretelli P, Wait R, Gelfi C: Metabolic modulation induced by chronic hypoxia in rats using a comparative proteomic analysis of skeletal muscle tissue. *J Proteome Res* 6 (2007) 1974-84

Deschauer M, Morgenroth A, Joshi PR, Gläser D, Chinnery PF, Aasly J, Schreiber H, Knape M, Zierz S, Vorgerd M: Analysis of spectrum and frequencies of mutations in McArdle disease. Identification of 13 novel mutations. *J Neurol* 254 (2007) 797-802

De Stefano N, Argov Z, Matthews PM, Karpati G, Arnold DL: Impairment of muscle mitochondrial oxidative metabolism in McArdle's disease. *Muscle Nerve* 19 (1996) 764-769

8 LITERATURVERZEICHNIS

Engel AG, Potter CS, Rosevear JW: Nucleotides and adenosine monophosphate deaminase activity of muscle in primary hypokalaemic periodic paralysis. *Nature*. 202 (1964) 670-672

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* 103 (2007) 315-322

Fishbein WN, Armbrustmacher VW, Griffin JL: Myoadenylate Deaminase Deficiency: A New Disease of Muscle. *Science* 200 (1978) 545-548

Fishbein WN: Myoadenylate Deaminase Deficiency: Inherited and Acquired Forms. *Biochem Med* 33 (1985) 158-69

Fishbein WN: Primary, Secondary and Coincidental Types of Myoadenylate Deaminase Deficiency. *Ann Neurol* 45 (1999) 547-548

Funasaka T, Yanagawa T, Hogan V, Raz A: Regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor expression by hypoxia. *FASEB J* 19 (2005) 1422-1430

Gibala MJ, Tarnopolsky MA, Graham TE: Tricarboxylic acid cycle intermediates in human muscle at rest and during prolonged cycling. *Am Physiol Soc* 272 (1997) E239-234

Gómez-Gallego F, Santiago C, Morán M, Pérez M, Maté-Muñoz JL, del Valle MF, Rubio JC, Garcia-Consuegra I, Foster C, Andreu IA, Martín MA, Arenas J, Lucia A: The I allele of the ACE gene is associated with improved exercise capacity in women with McArdle disease. *Br J Sports Med* 42 (2008) 134-140

Gross M: Clinical heterogeneity and molecular mechanism in inborn muscle AMP deaminase deficiency. *J Inher Metab Dis* 20 (1997) 186-192

Haller RG, Clausen T, Vissing J: Reduced levels of skeletal muscle Na⁺K⁺-ATPase in McArdle disease. *Neurology* 50 (1997) 37-40

Haller RG, Vissing J: Spontaneous "Second Wind" and Glucose-Induced Second "Second Wind" in McArdle Disease. *Arch Neurol* 59 (2002) 1395-1402

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Haller RG, Wyrick P, Taivassalo T, Vissing J: Aerobic Conditioning: An Effective Therapy in McArdle's Disease. *Ann Neurol* 59 (2006) 922-928
- Hancock CR, Janssen E, Terjung RL: Skeletal muscle contractile performance and ADP accumulation in adenylate-kinase deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 288 (2005) C1287-1297
- Hanisch F, Hellsten Y, Zierz S: Ecto- and cytosolic 5'-nucleotidases in normal and AMP deaminase-deficient human skeletal muscle. *Biol Chem* 387 (2006) 53-58
- Hanisch F, Joshi P, Zierz S: AMP deaminase deficiency in skeletal muscle is unlikely to be of clinical relevance. *J Neurol* 255 (2008) 318-322
- Hanisch F, Zierz S: AMP Deaminase Deficiency Does Not Affect Glycolytic Capacity in Skeletal Muscle during Standardized Ischemic Forearm Exercise Test. *J Exerc Physiol Online* 14 (2011) 59-63
- Hansford RG: Control of mitochondrial substrate oxidation. *Curr Top Bioenerg* 10 (1980) 217-278
- Heller SL, Brooke MH, Kaiser KK, Choski R: 2,4-Dinitrophenol, muscle biopsy, and McArdle's disease. *Neurology* 38 (1988) 15-19
- Howell JM, Walker KR, Davies L, Dunton E, Everaardt A, Laing N, Karpati G: Adenovirus and adeno-associated virus-mediated delivery of human myophosphorylase cDNA and LacZ cDNA to muscle in the ovine model of McArdle's disease: expression and re-expression of glycogen phosphorylase. *Neuromuscul Disord* 18 (2008) 248-258
- Huber K, Petzold J, Rehfeldt C, Ender K, Fiedler I: Muscle energy metabolism: structural and functional features in different types of porcine striated muscle. *J muscle Res Cell Motil* 28 (2007) 249-258
- Hubert C, Houot A-M, Corvol P, Soubrier S: Structure of the Angiotensin I-converting Enzyme Gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 266 (1991) 15377-15383

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Katz A, Sahlin A, Henriksson J: Muscle ammonia metabolism during isometric contractions in humans. *Am Physiol Soc* 250 (1986) C834-840
- Kazemi-Esfarjani P, Skomorowska E, Jensen TD, Haller RG, Vissing J: A nonischemic forearm exercise test for McArdle disease. *Ann Neurol* 52 (2002) 153-159
- Kono N, Mineo I, Sumi S, Shimizu T, Kang J, Nonaka K, Tarui S: Metabolic basis of improved exercise tolerance: muscle phosphorylase deficiency after glucagon administration. *Neurology* 34 (1984) 1471-1476
- Krasnianski A, Deschauer M, Neudecker S, Gellerich FN, Müller T, Schoser BG, Krasnianski M, Zierz S: Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies. *Brain* 128 (2005) 1870-6
- Lewis SF, Haller RG, Cook JD, Nunnally RL: Muscle fatigue in McArdle's disease studied by ³¹P-NMR: effect of glucose infusion. *J Appl Physiol* 59 (1985) 1991-1994
- Lewis SF, Haller RG: Review. The pathophysiology of McArdle's disease: clues to regulation in exercise and fatigue. *J. Appl. Physiol* 61 (1986) 391-401
- Lieberman J: Elevation of serum angiotensin - converting - enzyme (ACE) level in sarcoidosis. *Am J Med* 59 (1979) 365-372
- Lindner A, Reichert N, Eichhorn M, Zierz S: Acute compartment syndrome after forearm ischemic work test in a patient with McArdle's disease. *Neurology* 56 (2001) 1779-1780
- Löfberg M, Lindholm H, Näveri H, Majander A, Suomalainen A, Paetau A, Sovijärvi A, Härkönen M, Somer H: ATP, phosphocreatine and lactate in exercising muscle in mitochondrial disease and McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 11 (2001) 370-375
- Lowenstein JM: The purine nucleotide cycle revised. *Int J Sports Med* 11 (1990) 37-46
- Lucia A, Nogales-Gadea G, Pérez M, Martín MA, Andreu AL, Arenas J: Review. McArdle disease: what do neurologists need to know? *Nat Clin Pract Neurol* 4 (2008) 568-577

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Marian AJ, Yu QT, Workman R, Greve G, Roberts R: Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Lancet* 342 (1993) 1085-1086
- Martín MA, Rubio JC, Buchbinder J, Fernández-Hojas R, del Hoyo P, Teijeira S, Gámez J, Navarro C, Fernández JM, Cabello A, Campos Y, Cervera C, Culebras JM, Andreu AL, Fletterick R, Arenas J: Molecular heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): a genotype-phenotype correlation study. *Ann Neurol* 50 (2001) 574-581
- 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* 53 (2003) 497-502
- Matsuura S, Igarashi M, Tanizawa Y, Yamada M, Kishi F, Kajii T, Fujii H, Miwa S, Sakurai M, Nakazawa A: Human Adenylate Kinase Deficiency Associated with Hemolytic Anemia. *J Biol Chem* 264 (1989) 10148-10155
- Meyer RA, Terjung RL: Differences in ammonia and adenylate metabolism in contracting fast and slow muscle. *Am Physiol Soc* 237 (1979) C111-8
- Mineo I, Kono N, Shimizu T, Hara N, Yamada Y, Sumi S, Nonaka K, Tarui S: Excess Purine Degradation in Exercising Muscles of Patients with Glycogen Storage Disease Types V and VII. *J Clin Invest* 76 (1985) 556-560
- Mineo I, Kono N, Hara N, Shimizu T, Yamada Y, Kawachi M, Kiyokawa H, Wang YL, Tarui S: Myogenic hyperuricemia. A common pathophysiologic feature of glycogenosis types III, V, and VII. *N Engl J Med* 317 (1987) 75-80
- Miteff F, Potter HC, Teoh H, Roxburgh R, Hutchinson DO: Clinical and laboratory features of patients with myophosphorylase deficiency (McArdle disease). *J Clin Neurosci* 18 (2011) 1055-1058
- 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 USA* 89 (1992) 6457-6461
- Morisaki T, Homes EW: Functionally Distinct Elements Are Required for Expression of the AMPD1 Gene in Myocytes. *Mol Cell Biol* 13 (1993) 5854-5860

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Noma T. Review: Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena. *J Med Invest* 52 (2005) 127-136
- Norman B, Glenmark B, Jansson E: Muscle AMP deaminase deficiency in 2% of a healthy population. *Muscle Nerve* 18 (1995) 239-241
- Norman B, Mahnke-Zizelman DK, Vallis A, Sabina RL: Genetic and other determinants of AMP deaminase activity in healthy adult skeletal muscle. *J Appl Physiol* 85 (1998) 1273-1278
- Norman B, Sabina RL, Jansson E: Regulation of skeletal muscle ATP catabolism by AMPD1 genotype during sprint exercise in asymptomatic subjects. *J Appl Physiol* 91 (2001) 258-264
- Ørngreen MC, Jeppesen TD, Andersen ST, Taivassalo T, Hauerslev S, Preisler N, Haller RG, van Hall G, Vissing J: Fat metabolism during exercise in patients with McArdle disease. *Neurology* 72 (2009) 718-724
- Panayiotou C, Solaroli N, Xu Y, Johansson M, Karlsson A: The characterization of human adenylate kinases 7 and 8 demonstrates differences in kinetic parameters and structural organization among the family of adenylate kinase isoenzymes. *Biochem J* 433 (2011) 527-534
- Pancholi V, Chhatwal G: Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int J Med Microbiol* 293 (2003) 391-401
- Paradas C, Fernandez-Cadenas I, Gallardo E, Lligé D, Arenas J, Illa I, Andreu AL: Variable presentation of the clinical phenotype of McArdle's disease in a kindred harbouring a novel compound genotype in the muscle glycogen phosphorylase gene. *Neurosci Lett* 391 (2005) 28-31
- Quinlivan R, Buckley J, James M, Twist A, Ball S, Duno M, Vissing J, Bruno C, Cassandrini D, Roberts M, Winer J, Rose M, Sewry C: McArdle disease: a clinical review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81 (2010) 1182-1188
- Radda GK: Control of bioenergetics: from cells to man by phosphorus nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. Eighteenth CIBA medal lecture. *Biochem Soc Trans* 14 (1986) 517-525

8 LITERATURVERZEICHNIS

Reisch AS, Elpeleg O: Biochemical Assays for Mitochondrial Activity: Assays of TCA cycle enzymes and PDHc. *Methods Cell Biol* 80 (2007) 199-222

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F: An Insertion/Deletion Polymorphism in the Angiotensin I-converting Enzyme Gene accounting for Half the Variance of Serum Enzyme Levels. *J Clin Invest* 86 (1990) 1343-1346

Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F: PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1. *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 1433

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* 422 (2007) 217-222

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* 29 (2008) 331-335

Rumpf KW, Wagner H, Kaiser H, Meinck HM, Goebel HH, Scheler F: Increased ammonia production during forearm ischemic work test in McArdle's disease. *Klin Wochenschr* 59 (1981) 1319-1320

Sabina RL, Swain JL, Patten BM, Ashizawa T, O'Brien WE, Holmes EW: Disruption of the Purine Nucleotide Cycle. A potential explanation for muscle dysfunction in myoadenylate deaminase deficiency. *J Clin Invest* 66 (1980) 1419-1423

Sabina RL, Swain JL, Olanow CW, Bradley WG, Fishbein WN, DiMauro S, Holmes EW: Myoadenylate Deaminase Deficiency Functional and Metabolic Abnormalities Associated with Disruption of the Purine Nucleotide Cycle. *J Clin Invest* 73 (1984) 720-730

Sabina RL, Marquetant R, Desai NM, Kaletha K, Holmes EW: Cloning and Sequence of Rat Myoadenylate Deaminase cDNA. *J Biol Chem* 262 (1987) 12397-12400

8 LITERATURVERZEICHNIS

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* 265 (1990) 9423-33

Sahlin K, Palmskog G, Hultman E: Adenine Nucleotide and IMP Contents of the Quadriceps Muscle in Man after Exercise. *Pflügers Arch* 374 (1978) 193-198

Sahlin K, Areskog NH, Haller RG, Henriksson KG, Jorfeldt L, Lewis SF: Impaired oxidative metabolism increases adenine nucleotide breakdown in McArdle's disease. *J Appl Physiol* 69 (1990) 1231-1235

Sahlin K, Jorfeldt L, Henriksson KG, Lewis SF, Haller RG: Tricarboxylic acid cycle intermediates during incremental exercise in healthy subjects and in patients with McArdle's disease. *Clin Sci* 88 (1995) 687-693

Selak MA, de Chadarevian JP, Melvin JJ, Grover WD, Salganicoff L, Kaye EM: Mitochondrial activity in Pompe's disease. *Pediatr Neurol* 23 (2000) 54-7

Shepherd D, Garland PB: The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J* 114(1969) 597-610

Sinkeler SP, Wevers RA, Joosten EM, Binkhorst RA, Oei LT, Van't Hof MA, De Haan AF: Improvement of screening in exertional myalgia with a standardized ischemic forearm test. *Muscle Nerve* 9 (1986a) 731-737

Sinkeler SR, Joosten EM, Wevers RA, Binkhorst RA, Oerlemans FT, van Bennekom CA, Coerwinkel MM, Oei LT: Ischaemic exercise test in myoadenylate deaminase deficiency and McArdle's disease: measurement of plasma adenosine, inosine and hypoxanthine. *Clin Sci* 70 (1986b) 399-401

Sinkeler SP, Binkhorst RA, Joosten EM, Wevers RA, Coerwinkel MM, Oei TL: AMP deaminase deficiency: study of the human skeletal muscle purine metabolism during ischaemic isometric exercise. *Clin Sci* 72 (1987) 475-482

Stanojevic V, Habener JF, Holz GG, Leech, CA: Cytosolic adenylate kinases regulate K-ATP channel activity in human β -cells. *Biochem Biophys Res Commun* 368 (2008) 614-619

8 LITERATURVERZEICHNIS

Sugden PH, Newsholme EA: The Effects of Ammonium, Inorganic Phosphate and Potassium Ions on the Activity of Phosphofructokinases from Muscle and Nervous Tissues of Vertebrates and Invertebrates. *Biochem J* 150 (1975) 133-122

Tarnopolsky MA, Parise G, Gibala MJ, Graham TE, Rush JWE: Myoadenylatdeaminase deficiency does not affect muscle anaplerosis during exhaustive exercise in humans. *Jour Physiol* 533 (2001) 881-889

Thomaes T, Thomis M, Onkelinx S, Fagard R, Matthijs G, Buys R, Schepers D, Cornelissen V, Vanhees L: A genetic predisposition score for muscular endophenotypes predicts the increase in aerobic power after training: the CAREGENE study. *BMC Genet* 12 (2011) 84

Valen PA, Nakayama DA, Veum J, Suleiman AR, Wortmann RL: Myoadenylate deaminase deficiency and forearm ischemic exercise testing. *Arthritis Rheum* 30 (1987) 661-668

Van Kuppevelt, Sabina RL, Ogasawara, Fishbein WN: Immunolocalization of AMPD isozymes in human skeletal muscle. *J Histochem Cytochem* 42 (1994) 861-868

Verzijl HT, van Engelen BG, Luyten JA, Steenbergen GC, van den Heuvel LP, ter Laak HJ, Padberg GW, Wevers RA: Genetic Characteristics of Myoadenylate Deaminase Deficiency. *Ann Neurol* 44 (1998) 140-143

Verzijl HT, van Engelen BG, Luyten JA, Steenbergen GC, van den Heuvel LP, ter Laak HJ, Padberg GW, Wevers RA: Reply to „Primary, Secondary and Coincidental Types of Myoadenylate Deaminase Deficiency”. *Ann Neurol* 45 (1999) 548

Vissing J, Haller RG: The Effect of Oral Sucrose on Exercise Tolerance in Patients with McArdle's Disease. *N Engl J Med* 349 (2003) 2503-2509

Wagenmakers AJM, Coakley JH, Edwards RHT: Metabolism of Branched-Chain Amino Acids and Ammonia During Exercise: Clues from McArdle's Disease. *Int J Sports Med* 11 (1990) S101-113

Wheeler TJ, Lowenstein JM: Adenylate Deaminase from Rat Muscle. *J Biol Chem* 245 (1979) 8994-8999

8 LITERATURVERZEICHNIS

Whitlock DM, Terjung RL: ATP depletion in slow-twitch red muscle of rat. *Am J Physiol* 253 (1987) 426-432

Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 175 (1988) 231-237

Williams AG, Rayson MP, Jubb M, World M, Woods DR, Hayward M, Martin J, Humphries SE, Montgomery HE: The ACE gene and muscle performance. *Nature* 403 (2000) 614

Zange J, Grehl T, Disselhorst-Klug C, Rau G, Müller K, Schröder R, Tegenthoff M, Malin JP, Vorgerd M: Breakdown of adenine nucleotide pool in fatiguing skeletal muscle in McArdle's disease: a noninvasive ³¹P-MRS and EMG study. *Muscle Nerve* 27 (2003) 728-736

Zeleznikar RJ, Heyman RA, Graeff RM 11, Walseth TF, Dawis SM, Butz EA, Goldberg ND: Evidence for Compartmentalized Adenylate Kinase Catalysis Serving a High Energy Phosphoryl Transfer Function in Rat Skeletal Muscle. *J Biol Chem* 265 (1990) 300-311

Zierz, Jerusalem: Muskelerkrankungen. Thieme, 2. Auflage (1991) S. 163

Zöllner N, Reiter S, Gross M, Pongratz D, Reimers CD, Gerbitz K, Paetzke I, Deufel T, Hübner G: Myoadenylate deaminase deficiency: successful symptomatic therapy by high dose oral administration of ribose. *Klin Wochenschr* 64 (1986) 1281-1290

9. Tabellenanhang

Tab.1 und 2: McArdle-Patienten (linke Tabelle) und Kontrollen (rechte Tabelle). Die Daten sind aufgeführt nach Geschlecht, PYGM-Mutation, Alter zum Zeitpunkt der Probeentnahme und Biopsiemuskel.

No. (Geschl.)	PYGM-Mutation	Alter (Jahre)	Muskel	No. (Geschl.)	Alter (Jahre)	Muskel
1 (w)	p.Y84X/p.R93W*	33	mbb	1 (w)	29	mbb
2 (m)	p.R50X/p.G204S*	n.b.	n.b.	2 (w)	50	mgc
3 (w)	p.R50X/p.R50X*	48	n.b.	3 (w)	29	mbb
4 (w)	p.R50X/p.K574E*	n.b.	n.b.	4 (m)	64	mbb
5 (m)	p.R50X/p.T129H*	67	mvl	5 (m)	37	mbb
6 (w)	c2262delA/p.M680V*	53	mdel	6 (m)	26	mbb
7 (m)	p.R50X/p.R50X*	30	mta	7 (m)	46	mvl
8 (w)	p.R93W/p.R93W*	69	n.b.	8 (m)	17	mbb
9 (w)	p.R50X/c.753delA*	13	mql	9 (w)	42	n.b.
10 (w)	p.R269X/p.R269X*	22	mvl	10 (m)	19	mbb
11 (m)	p.R50X/p.R50X*	40	n.b.	11 (w)	29	mbb
				12 (m)	53	mvl
				13 (w)	37	mbb
				14 (m)	20	mbb
				15 (m)	30	mvl
				16 (m)	45	mgc
				17 (w)	34	mdel
				18 (w)	44	mbb
				19 (w)	33	mbb
				20 (m)	33	mbb
				21 (m)	42	mbb
				22 (m)	55	mbb
				23 (w)	53	mbb
				24 (m)	36	mbb
				25 (m)	52	mgc
				26 (m)	43	mbb
				27 (m)	47	mvl

*Daten im Rahmen anderer Arbeiten oder zu diagnostischen Zwecken erhoben; No. = nummerierende Aufzählung, ohne Zusammenhang zu nachfolgenden Abbildungen dieser Arbeit; Geschl. = Geschlecht. w = weiblich; m = männlich, mbb = musculus biceps brachii; mvl = musculus vastus lateralis; mta = musculus tibialis anterior; mde = Imusculus deltoideus; n.b. nicht bekannt.

9 TABELLENANHANG

Tab.11: Zusammengefasste molekulargenetische, klinische und biochemische Daten der analysierten Muskelproben der 11 McArdle-Patienten

No.	AMPD1	ACE-	ΔNH_3	ΔLak	AMPD	AMPD/CS	AMPD/PGI	AK	AK/CS	AK/PGI
1	-/+	D/D*	143,6*	-0,3*	105,8	1,05	0,06	1544,3	15,4	0,92
2	-/+	D/I*	n.b.	n.b.	158,7	1,67	0,06	3444,5	36,4	1,25
3	-/-	D/I*	n.b.	n.b.	261,0	2,6	0,10	2199,2	21,9	0,88
4	-/-*	D/I*	n.b.	n.b.	378,0	4,77	0,18	3251,4	32,1	1,22
5	-/-	D/D	n.b.	n.b.	381,1	5,26	0,21	2950,0	40,8	1,60
6	-/-	D/I	397,0*	0,9*	431,9	2,9	0,16	3989,6	26,8	1,46
7	-/-*	D/I*	n.b.	n.b.	435,6	2,51	0,13	2701,1	15,6	0,92
8	-/-*	D/D*	n.b.	n.b.	449,6	4,6	0,15	3686,8	37,7	1,27
9	-/-*	D/I*	161,0*	0*	465,1	3,9	0,13	5293,1	44,3	1,48
10	-/-	D/I*	379,8**	0,7*	498,4	7,3	0,24	3096,1	30,1	1,00
11	-/-*	D/I*	n.b.	n.b.	562,7	4,73	0,18	5531,8	46,5	1,80

*Daten im Rahmen anderer Arbeiten oder zu diagnostischen Zwecken erhoben im Muskellabor der Universitätsklinik für Neurologie in Halle; ** Wert außerhalb erhoben; No. = nummerierende Aufzählung, ohne Zusammenhang zu vorangehenden Abbildungen dieser Arbeit; n.b. nicht bestimmt. -/+ heterozygot für Mutation; -/- Wildtyp; Enzymaktivitätsangaben erfolgen in U/g NCP, der Übersichtlichkeit halber in diesem Fall ohne SD. Die Angabe der Metabolitdifferenzen erfolgt in $\mu\text{mol/l}$ (NH_3) bzw. mmol/l (Laktat).

9 TABELLENANHANG

Tab.12: Zusammengefasste molekulargenetische, klinische und biochemische Daten der analysierten Muskelproben der 27 Kontrollen

No.	AMPD1	Δ NH ₃	Δ Lak	AMPD	AMPD/CS	AMPD/PGI	AK	AK/CS	AK/PGI
1	+/-	74,0*	4,5*	129,0	1,35	0,07	3034,5	38,3	2,06
2	+/-	94,6*	4,4*	187,8	1,77	0,13	2428,8	22,3	1,65
3	+/-	74,0*	1,5*	191,5	2,35	0,13	2629,9	31,1	1,71
4	+/-	28,0*	2,7*	208,2	2,5	0,08	5229,2	75,0	2,51
5	+/-	40,5*	3,6*	228,6	1,99	0,1	3689,7	32,9	1,78
6	+/-	108,0*	4,5*	269,5	2,93	0,14	3837,6	37,4	1,79
7	+/-	38,0*	4,9*	321,8	4,26	0,14	4073,4	51,7	1,69
8	-/-	57,0*	3,2*	363,8	2,82	0,17	4511,5	36,1	2,21
9	-/-	55,1*	1,5*	363,9	4,51	0,18	3432,5	63,5	2,60
10	-/-	35,0*	4,1*	371,2	3,33	0,16	4913,6	42,0	2,03
11	-/-	39,0*	3,9*	393,3	3,3	0,2	2936,8	29,7	1,79
12	-/-	61,0*	6,7*	415,2	5,08	0,22	3998,5	47,4	2,05
13	-/-	120,0*	4,4*	425,9	6,17	0,31	2245,4	32,7	1,65
14	-/-	16,0*	2,3*	453,0	5,79	0,26	4356,2	64,1	2,91
15	-/-	163,0*	7,5*	446,4	3,64	0,21	2847,7	22,0	1,28
16	-/-	53,0*	4,5*	452,7	4,00	0,29	2326,3	22,5	1,65
17	-/-	28,2*	2,4*	490,3	5,85	0,26	2815,6	40,1	1,80
18	-/-	30,7*	2,6*	512,6	3,73	0,27	3446,5	35,0	2,56
19	-/-	74,8*	3,4*	525,3	4,86	0,19	4485,1	64,0	2,40
20	-/-	29,5*	3,4*	527,5	7,23	0,26	4177,4	64,1	2,29
21	-/-	34,7*	3,7*	529,2	8,25	0,27	3436,0	55,1	1,79
22	-/-	20,0*	3,4*	535,5	4,22	0,28	3056,9	37,4	1,55
23	-/-	110,0*	3,3*	590,0	9,23	0,32	5215,0	100,1	3,48
24	-/-	71,0*	4,2*	606,1	6,91	0,33	3769,1	44,5	2,10
25	-/-	54,00*	4,4*	606,1	3,8	0,25	3449,0	22,8	1,48
26	-/-	121,10*	5,1*	622,7	9,89	0,32	3806,9	76,8	2,52
27	-/-	42,00*	4,3*	702,6	7,68	0,32	2677,7	28,1	1,18

*Daten im Rahmen anderer Arbeiten oder zu diagnostischen Zwecken erhoben; No. = nummerierende Aufzählung, ohne Zusammenhang zu vorangehenden Abbildungen dieser Arbeit; +/- heterozygot für Mutation; -/- Wildtyp; Enzymaktivitätsangaben erfolgen in U/g NCP, der Übersichtlichkeit halber in diesem Fall ohne SD. Die Angabe der Metabolitdifferenzen erfolgt in μ mol/l (NH₃) bzw. mmol/l (Laktat).

10. Thesen

1. Die in der Literatur erwähnten stark erhöhten Serumspiegel des während muskulärer Arbeit entstehenden Metaboliten Ammoniak bei Patienten der Glycogenose Typ V (McArdle-Erkrankung) lassen sich reproduzieren und können diagnostische Hinweise liefern.
2. Die Höhe der Ammoniakanstiege während muskulärer Arbeit korreliert bei gesunden Personen nicht mit dem Vorhandensein eines mutierten Allels des AMPD1-Gens. Dieses Gen codiert für das muskuläre Isoenzym der AMP-Deaminase, welches für die Entstehung von Ammoniak im Muskel als hauptsächlich verantwortlich gilt.
3. Die für die AMPD1-Mutation heterozygoten McArdle-Patienten und Kontrollen weisen signifikant verringerte AMP-Deaminase-Aktivitäten im Vergleich zum Wildtyp auf.
4. Entgegen anderer Studienergebnisse überlappen sich die Enzymaktivitätsbereiche von AMPD1-Heterozygoten und Individuen des Wildtyps in der vorliegenden Arbeit nicht.
5. Die Enzymaktivitätsbestimmung der für den hohen Ammoniakanstieg bei McArdle-Patienten verantwortlich geltenden Enzyme AMP-Deaminase und Adenylatkinase ergab kein höheres Aktivitätsniveau eines dieser beiden Enzym, was eine Enzyminduktion als Ursache der erhöhten Ammoniakproduktion nahezu ausschließt.
6. Die überraschenderweise signifikant höheren Aktivitäten der Phosphoglucoisomerase und Citratsynthase lassen auf Adaptationsvorgänge bei McArdle-Patienten schließen.
7. Ein Einfluss des Insertions-Deletions-Polymorphismus des ACE-Gens auf die Höhe der Aktivitäten der AMPD und AK bei McArdle-Patienten konnte nicht gefunden werden.
8. Jedoch weisen die McArdle-Patienten des ACE-Genotyps DI gegenüber dem Genotyp DD eine höhere Aktivität des glykolytischen Enzyms PGI auf. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme anderer Autoren, dass die vorteilhafte Auswirkung des I-Allels bei McArdle-Patienten auf einer Induktion glykolytischer Enzyme beruht.

Lebenslauf

Name: Apitz
Vorname: Thekla
Geburtsdatum/ort: 09.11.1984 in Köthen (Anhalt)
wohnhaf: Guineastraße 35, 13351 Berlin
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig
Eltern: Martina Apitz, geboren 13.09.1960
Manfred Apitz, geboren 27.04.1961

Schulbildung

08/91 – 06/95 Grundsule „Johann Friedrich Naumann“ Köthen
08/95 – 07/04 „Ludwigsgymnasium Köthen“ ; Abitur (Note 1,3)

Ausbildungsgang

10/04 – 10/09 Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät
der „Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg“
08/06 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note „gut“)
ab 10/09 Studentin der Charité Berlin
10/09 – 02/10 Praktische Arbeit an der Dissertation, Thema: „Enzymaktivitäten der
AMP-Deaminase und Adenylatkinase im Skelettmuskel
von Patienten der McArdle-Myopathie“
bei Prof. Dr. med. Zierz, Universitäts- und Poliklinik für Neurologie des
Universitätsklinikums Halle
02/10 – 01/11 Praktisches Jahr
04/11 – 05/11 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note „gut“)
seit 10/11 Ärztin in Weiterbildung zum Facharzt für Allgemeine Innere
Medizin, im Krankenhaus Hedwigshöhe Berlin

Erklärung

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit, die von mir selbst verfasst wurde, und für die keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmitteln benutzt wurden, keine entgeltliche Hilfe von Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Fakultät vorgelegt; frühere Promotionsversuche fanden nicht statt.

Thekla Apitz

Berlin, d. 17.01.2014

Danksagung

Prof. Dr. S. Zierz gilt mein ausdrücklicher Dank für die Erarbeitung des Dissertationsthemas und die gemeinsame Inhaltserstellung. Meine Dankbarkeit gilt seinem zu jeder Zeit bereitstehendem Rat, seinen wertvollen Anregungen; der Begleitung durch die gesamte Arbeitszeit und nicht zuletzt seiner Geduld.

Ebenfalls Unterstützung und Rat erfuhr ich durch die ärztlichen Mitarbeiter der Universitäts- und Poliklinik für Neurologie, Herrn OA Prof. Dr. Deschauer und Herrn Dr. Hanisch, denen ich danken will.

Ich möchte den Mitarbeitern des Muskellabors meinen Dank ausdrücken für die tatkräftige Unterstützung, namentlich Dr. Pushpa Joshi, Frau Dr. Hauburger, und u.a. den Medizinisch Technischen Assistentinnen Frau K. Zietz und Frau T. Wangemann sowie der ehemaligen Mitarbeiterin Frau Dr. Knape.

Auch den Sekretärinnen des Chefarztsekretariats Frau K. Nickel und Frau C. Pabst möchte ich für die Entgegennahme meiner zahlreichen Telefonanrufe, die Auskünfte und Ratschläge danken.

Weiterhin danke ich meinen geduldigen Eltern Manfred und Martina Apitz, deren gedanklicher Unterstützung ich mir jeder Zeit gewiss sein durfte.